

Desenvolvimento e caracterização de películas compósitas de quitosano, lípidos e tripolifosfato

Sara Cristina dos Santos Solipa

Dissertação para o Grau de Mestre em

Engenharia Alimentar

Orientadores: Doutor Vítor Manuel Delgado Alves

Doutora Margarida Gomes Moldão Martins

Júri

Presidente: Doutora Fernanda Maria dos Reis Torroaes Valente Professora Auxiliar no Instituto Superior de Agronomia;

Vogais: Doutora Isabel Maria Rôla Coelho, Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa;

Doutor Vítor Manuel Delgado Alves, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Lisboa, 2016

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao meu orientador, Doutor Vítor Alves por todo o apoio, dedicação e ajuda prestada ao longo deste trabalho. Pela paciência e compreensão demonstrada todas as vezes que surgiram dificuldades e imprevistos e por todos os conhecimentos transmitidos.

Gostaria também de agradecer à minha orientadora, Doutora Margarida Moldão-Martins pela disponibilidade e grande ajuda prestada sempre que foi necessário.

Um grande obrigado aos Mestres Bernardo Ribeiro e Daniela Silva por tudo o que me ensinaram e pela grande ajuda e disponibilidade incansável que demonstraram na fase experimental deste trabalho.

Agradeço ainda a todos os bolseiros e doutorandos do departamento PAI pela simpatia, boa disposição e disponibilidade que sempre demonstraram.

Agradeço muito a toda a minha família e em especial aos meus pais e irmãos que ao longo da minha vida sempre me apoiaram e ajudaram nos momentos mais difíceis. Obrigado por sempre acreditarem em mim, por me darem força e por me fazerem sorrir.

Um especial obrigado ao meu namorado, Manuel Silva, que sempre acreditou em mim, por toda a paciência, ajuda, compreensão e força que me deu em todos os momentos, por nunca ter desistido de acreditar em mim nem nunca me deixar desistir de acreditar que tudo isto seria possível.

Um agradecimento a todos os meus amigos que ao longo da minha vida sempre me acompanharam, jamais esquecerei toda a ajuda que me deram nos momentos em que mais precisei e de todos os bons momentos que passamos juntos.

Um grande obrigado a todos.

Resumo

Neste trabalho estudou-se o efeito da utilização de lípidos (ácido oleico ou cera de abelha) e de um agente reticulante, tripolifosfato (TPP) no desenvolvimento de películas compósitas baseadas em quitosano. Fez-se variar simultaneamente a percentagem de ácido oleico ou cera de abelha (0 a 40%) e de TPP (0 a 5%), estudando o seu efeito nas propriedades (cor, microestrutura, propriedades higroscópicas e mecânicas) das películas obtidas.

Para as películas com ácido oleico, a quantidade deste composto é o fator com mais influência na permeabilidade das películas ao vapor de água. Observaram-se valores mais baixos de permeabilidade ($4 \text{ mol.m/m}^2.\text{s.Pa}$) para concentrações de óleo entre 25-35% e valores de TPP entre 1-5%, sendo que quase todas as formulações com essa composição apresentaram boas propriedades mecânicas.

Para as películas com cera de abelha, tanto a quantidade de cera como a de TPP influenciam significativamente a permeabilidade ao vapor de água. As formulações cujas permeabilidades são menores ($4 \text{ mol.m/m}^2.\text{s.Pa}$) contêm 35-40% de cera de abelha e 4-5% de TPP. Para esta gama de valores foi observada nas películas uma elevada rigidez.

Comparando os resultados obtidos nas formulações de cera com os de óleo é possível verificar que em ambos foi possível obter valores mínimos de permeabilidade idênticos, contudo nas formulações com óleo é possível atingir este valor de permeabilidade usando quantidades de óleo e TPP inferiores aos que são necessários nas formulações com cera. Desta forma as películas com óleo constituem uma vantagem, para além de utilizar quantidades inferiores, permitem a formação de películas mais homogêneas.

Palavras-chave: Quitosano, películas comestíveis, cera de abelha, ácido oleico, Tripolifosfato.

Abstract

In this work the effect of a lipid and a crosslinking agent, sodium tripolyphosphate (TPP) on the development of chitosan based films were evaluated. Different contents of oleic acid or beeswax (0 to 40%), and TPP (0 to 5%), were simultaneously used to study their effect on the properties of the films obtained.

The water vapour permeability of the films with oleic acid was influenced by the amount of this compound. Low permeability values were observed using oleic acid concentrations between 25-35% and TPP concentrations between 1-5%. Regarding the mechanical properties, almost all films with good permeability results showed good mechanical properties.

Beeswax films' water vapour permeability was influenced by the amount of beeswax and TPP. This study showed lower values when 35-40% of beeswax and 4-5% of TPP were applied. Although the films produced with beeswax and TPP ranges referred didn't show the highest Young's modulus, it can be considered that they have an acceptable stiffness.

The oil based films are advantageous regarding to the beeswax ones. To obtain a minimum on the permeability values, less amounts of lipid and TPP are required in the acid oleic formulations. In addition, these formulations allow the formation of more homogeneous films.

Keywords: Chitosan, edible films, beeswax, oleic acid, Tripolyphosphate

Índice

1.	Introdução e objetivos	1
2.	Enquadramento teórico	3
2.1	Importância dos hortofrutícolas	3
2.2	Qualidade dos hortofrutícolas	3
2.3	Fatores que afetam a qualidade dos produtos	4
2.3.1	Fatores inerentes ao produto	4
2.3.2	Fatores fisiológicos	6
2.3.3	Danos mecânicos	7
2.3.4	Fatores ambientais	8
2.4	Embalagens	8
2.5	Revestimentos/Películas comestíveis	9
2.6	Tipos de revestimentos/películas comestíveis	10
2.6.1	Hidrocoloidais	10
2.6.2	Lipídicos	10
2.6.3	Compósitos	11
2.7	Quitosano	11
2.7.1	Produção de quitosano	12
2.7.2	Propriedades do quitosano	13
3.	Materiais e Métodos	15
3.1	Preparação das películas	15
3.1.1	Delineamento experimental	15
3.1.2	Preparação da solução filmogénica de quitosano	17
3.1.3	Películas compósitas de ácido oleico	17
3.1.4	Películas compósitas de cera de abelha	19
3.2	Aparência das películas	19
3.2.1	Medição da espessura das películas	20
3.2.2	Medição da cor e transparência	20
3.2.3	Microscopia	21

3.3	Propriedades higroscópicas.....	22
3.3.1	Capacidade de absorção de água e solubilidade.....	22
3.3.2	Isotermas de adsorção	22
3.3.3	Permeabilidade ao vapor de água	23
3.4	Propriedades mecânicas	26
3.4.1	Testes de extensão	26
3.4.2	Testes de perfuração.....	28
3.5	Análise estatística.....	29
4.	Apresentação dos resultados e discussão	31
4.1	Aparência das películas.....	31
4.1.1	Espessura	33
4.1.2	Mediação da cor	33
4.1.2.1	Cor Branca.....	33
4.1.2.2	Cor Verde	35
4.1.2.3	Cor Amarela.....	37
4.1.2.4	Cor vermelha	37
4.1.3	Microscopia	39
4.2	Propriedades higroscópicas.....	44
4.2.1	Solubilidade e capacidade de absorção de água.....	44
4.2.2	Isotermas de adsorção de água.....	49
4.2.3	Permeabilidade ao vapor de água	51
4.3	Propriedades mecânicas	55
4.3.1	Testes de extensão	55
4.3.2	Testes de perfuração.....	58
5.	Conclusão	62
6.	Trabalho Futuro.....	64
7.	Referências bibliográficas	65

Índice de Tabelas

Tabela 1: Principais microrganismos responsáveis pela perda de qualidade nos Hortofrutícolas.....	6
Tabela 2: Níveis utilizados no DCCR para as variáveis de conteúdo lipídico (ácido oleico/cera de abelha) e agente reticulante (tripolifosfato).....	16
Tabela 3: Delineamento fatorial completo para a composição dos películas.....	16
Tabela 4: Parâmetros do modelo de Oswin utilizados para ajustar as isotermas de adsorção.....	51
Tabela 5: Resultados verificados para a permeabilidade no estudo de Velickova et al. (2013).....	55

Índice de Figuras

Figura 1: Estrutura química do quitosano (Fonte: Borgognoni et al., 2006).....	12
Figura 2: Estrutura química da quitina (Fonte: Borgognoni et al., 2006).....	12
Figura 3: Representação esquemática do processo de desacetilação (Fonte: Barros, 2008).....	13
Figura 4: Diferentes formas geométricas, das películas, necessárias para a realização dos testes.....	18
Figura 5: Representação esquemática do método CIELAB (Fonte: Fonseca, 2012)...	20
Figura 6: Representação esquemática do teste da permeabilidade.....	24
Figura 7: Representação esquemática do processo de transporte do vapor de água através do filme.....	25
Figura 8: Representação esquemática do teste da perfuração.....	29
Figura 9: Amostras dos diferentes tipos de formulações, a) 6% ácido oleico; b) 20% ácido oleico; c) 34% ácido oleico; d) 40% ácido oleico; A) 6% cera de abelha; B) 20% cera de abelha; C) 34% cera de abelha; D) 40% cera de abelha.....	31
Figura 10: Películas de quitosano na linha a) com 20% de ácido oleico e na linha b) com 20% de cera de abelha.....	32
Figura 11: Películas de quitosano sem lípido, antes (b) e após (a) a aplicação de uma solução de 2,5% de TPP.....	32
Figura 12: Superfície de resposta da diferença de cor para a cor branca obtida com as películas de óleo. ΔE (Cor Branca) = $8,12 + 0,98 AO - 0,03^* AO2 + 6,69 TPP - 1,86^* TPP2 + 0,07 AO TPP$; com um R2 de 0,87 e um R2 ajustado de 0,70 . * Variáveis que influenciam significativamente a variável dependente (p<0,05).....	33
Figura 13: Superfície de resposta da diferença de cor para a cor branca obtida com as películas de cera. ΔE (Cor Branca) = $26,96 + 0,47 CA - 0,008 CA2 - 10,73 TPP + 2,01^* TPP2 - 0,036 CA TPP$; com um R2 de 0,89 e um R2 ajustado de 0,75. * Variável que influencia significativamente a variável dependente (p<0,05).....	34

Figura 14: Superfície de resposta da diferença de cor para a cor verde obtida com as películas de cera. ΔE (Cor Verde) = $6,55 + 0,55 \cdot CA - 0,007 CA^2 + 0,47 TPP + 0,05 TPP^2 - 0,05 CA TPP$; com um R² de 0,80 e um R² ajustado de 0,59. * Variável que influencia significativamente a variável dependente ($p < 0,05$).....35

Figura 15: Valores de ΔE , relativos à cartolina de cor verde, para cada um dos ensaios de óleo e cera, onde C representa a média dos ensaios centrais. As barras pretas representam o desvio padrão. As letras a e b são dadas pela análise estatística das médias dos ensaios de cera, sendo que as letras minúsculas (a ou b) representam películas de óleo com médias significativamente diferentes.....36

Figura 16: Valores de ΔE , relativos à cartolina de cor amarela, para cada um dos ensaios com óleo e cera, onde C representa a média dos ensaios centrais. As letras a, b, ab, A, B e AB são dadas pela análise estatística das médias dos ensaios de óleo e cera, sendo que as letras minúsculas (a ou b) representam películas de óleo com médias significativamente diferentes; e as letras maiúsculas (A ou B) representam, películas de cera com médias significativamente diferentes. As barras pretas representam o desvio padrão.....37

Figura 17: Superfície de resposta da diferença de cor para a cor vermelha obtida com as películas de cera. ΔE (Cor Vermelha) = $2,48 + 0,70 \cdot CA - 0,007 CA^2 + 2,83 TPP - 0,18 TPP^2 - 0,07 CA TPP$; com um R² de 0,85 e um R² ajustado de 0,70. * Variável que influencia significativamente a variável dependente ($p < 0,05$).....38

Figura 18: Valores de ΔE , relativos à cartolina de cor vermelha, para cada um dos ensaios de óleo e cera, onde C representa a média dos ensaios centrais. As barras pretas representam o desvio padrão. As letras a, b, c, ab, cd, abc, ac são dadas pela análise estatística das médias dos ensaios de cera, sendo que as letras minúsculas (a, b ou c) representam películas de cera com médias significativamente diferentes.....39

Figura 19: Microestrutura das películas de CA, obtida pela técnica SEM com diferentes ampliações: a) 170 b) 400 c) 1000.....40

Figura 20: Microestrutura das películas de CA, obtida pela técnica SEM com diferentes ampliações: a) 170 b) 400 c) 1000.....41

Figura 21: Microestrutura das películas de AO, obtida pela técnica SEM com diferentes ampliações: a) 170 b) 400 c) 1000.....42

Figura 22: Microestrutura das películas de AO, obtida pela técnica SEM com diferentes ampliações: a) 170 b) 400 c) 1000.....	43
Figura 23: Superfície de resposta obtida para a solubilidade das películas de óleo. Solubilidade = $19,44 - 0,13 AO + 0,006 AO^2 - 8,08 TPP + 1,553* TPP^2 + 0,01 AO TPP$; com um R ² de 0,80 e um R ² ajustado de 0,59. * Variável que influencia significativamente a variável dependente (p<0,05).....	44
Figura 24: Solubilidade em água das películas com cera de abelha e ácido oleico, onde o C representa a média dos ensaios centrais. As barras pretas representam o desvio padrão. As letras a, c, bc, ab, abc são dadas pela análise estatística das médias dos ensaios de óleo, sendo que as letras minúsculas (a ou c) representam películas de óleo com médias significativamente diferentes. As barras pretas representam o desvio padrão.....	45
Figura 25: Superfície de resposta obtida para a capacidade de absorver água das películas de cera. Capacidade de absorção de água = $23,09 + 13,25 CA - 0,15 CA^2 + 58,65 TPP + 0,90 TPP^2 - 2,71* CA TPP$; com um R ² de 0,91 e um R ² ajustado de 0,81. * Variável que influencia significativamente a variável dependente (p<0,05).....	47
Figura 26: Capacidade de absorção de água, das películas de cera de abelha e ácido oleico, onde C representa a média dos ensaios centrais. As letras a, b e ab são dadas pela análise estatística das médias dos ensaios de ácido oleico, sendo que letras iguais representam médias que não diferem significativamente. As barras pretas representam o desvio padrão.....	48
Figura 27: Isotermas de adsorção para as películas com ácido oleico. As linhas correspondem ao ajuste do modelo de Oswin.....	49
Figura 28: Isotermas de adsorção para as películas com cera de abelha. As linhas correspondem ao ajuste do modelo de Oswin.....	50
Figura 29: Superfície de resposta obtida para a permeabilidade ao vapor de água das películas de óleo. $WVP \times 10^{-11} = 15,82 - 0,89* AO + 0,016* AO^2 - 1,97 TPP + 0,200 TPP^2 + 0,028 AO TPP$; com um R ² de 0,91 e um R ² ajustado de 0,83. * Variáveis que influenciam significativamente a variável dependente (p<0,05).....	52
Figura 30: Superfície de resposta obtida para a permeabilidade ao vapor de água das películas de cera. $WVP \times 10^{-11} = 8,93 - 0,18 CA* + 0,0017 CA^2 - 1,23* TPP + 0,095$	

TPP2 + 0,0074 CA TPP; com um R² de 0,89 e um R² ajustado de 0,79. * Variáveis que influenciam significativamente a variável dependente (p<0,05).....53

Figura 31: Tensão na rutura, no teste da extensão, para as películas de cera de abelha e ácido oleico, onde C representa a média dos ensaios centrais. As letras a, b, ab são dadas pela análise estatística das médias dos ensaios de óleo, sendo que letras iguais representam médias que não diferem significativamente. As barras pretas representam o desvio padrão.....56

Figura 32: Deformação na rutura, no teste da extensão, para as películas de cera de abelha e ácido oleico, onde C representa a média dos ensaios centrais. As letras a, b, ab são dadas pela análise estatística das médias dos ensaios de cera, sendo que letras iguais representam médias que não diferem significativamente. As barras pretas representam o desvio padrão.....56

Figura 33: Módulo de Young no teste da extensão para as películas de cera de abelha e ácido oleico, onde C representa a média dos ensaios centrais. As letras a e b são dadas pela análise estatística das médias dos ensaios de cera, sendo que letras iguais representam médias que não diferem significativamente. As barras pretas representam o desvio padrão.....57

Figura 34: Superfície de resposta obtida para o módulo de Young das películas de cera
Módulo de Young = $-32,17 + 15,98 \cdot CA - 0,57 \cdot CA^2 + 76,89 \cdot TPP - 19,09 \cdot TPP^2 + 2,85 \cdot CA \cdot TPP$; com um R² de 0,85 e um R² ajustado de 0,70. * Variáveis que influenciam significativamente a variável dependente (p<0,05).....57

Figura 35: Superfície de resposta obtida para a tensão de rutura das películas de cera
Tensão de rutura = $5,00 - 0,18 \cdot CA + 0,003 \cdot CA^2 + 1,64 \cdot TPP - 0,43 \cdot TPP^2 - 0,04 \cdot CA$; com um R² 0,96 de e um R² ajustado de 0,80. * Variáveis que influenciam significativamente a variável dependente (p<0,05).....59

Figura 36: Tensão na rutura, no teste da extensão, para as películas de cera de abelha e ácido oleico, onde C representa a média dos ensaios centrais. As letras a, b, c, ab, bc, A, D, BC, AB, CD e ABC são dadas pela análise estatística das médias dos ensaios de óleo e cera, sendo que letras iguais representam médias que não diferem significativamente. As barras pretas representam o desvio padrão.....60

Figura 37: Deformação na rutura para as películas de ácido oleico, onde C representa a média dos ensaios centrais. As letras b, c, ab, ac, e abc são dadas pela análise

estatística das médias dos ensaios de óleo, sendo que letras iguais representam médias que não diferem significativamente. As barras pretas representam o desvio padrão.....60

Figura 38: Deformação na rutura para as películas de cera de abelha, onde C representa a média dos ensaios centrais. As letras b, c, ab, ac, e abc são dadas pela análise estatística das médias dos ensaios de óleo, sendo que letras iguais representam médias que não diferem significativamente. As barras pretas representam o desvio padrão.....61

Índice de abreviaturas

AO: Ácido oleico

a_w : Atividade da água

CA: Cera de abelha

ΔE diferença total de cor

HF: Hortofrutícolas

pH: Potencial de Hidrogénio

TPP: Tripolifosfato

X (g H₂O / g sólido seco): Quantidade de água adsorvida ao longo do tempo no estudo das isothermas

WVP: Permeabilidade ao vapor de água

1. Introdução e objetivos

Na sociedade moderna, cada vez mais se observa uma maior preocupação com a manutenção de uma dieta saudável. A importância de certos alimentos como os frutos e hortícolas para a prevenção de determinadas doenças é reconhecida mundialmente, devido ao seu alto teor em vitaminas e compostos bioativos.

O grupo dos hortofrutícolas é bastante heterogéneo, contudo todos têm a mesma característica em comum: mesmo após a colheita, mantêm-se biologicamente ativos. As suas funções fisiológicas como a respiração, transpiração e produção de etileno são processos naturais inerentes à vida dos tecidos vegetais. Porém, quando se verifica algum fator de *stress* como danos mecânicos ou condições ambientais desfavoráveis, os frutos e hortícolas tendem a aumentar a velocidade com que realizam estas funções vitais, podendo levar à senescência e consequentemente a perdas comerciais.

A segurança microbiológica é outro fator muito importante a ter em conta, visto que dentro do grupo dos hortofrutícolas podemos encontrar muitos produtos bastantes suscetíveis à contaminação crescimento microbiano que leva a grandes perdas comerciais, especialmente no campo ou durante o armazenamento.

Atualmente a fileira alimentar e a sociedade em geral têm ainda preocupações com a criação de um futuro mais sustentável procurando aplicar políticas de proteção ambiental. Um dos elementos fundamentais em quase todos os sistemas de produção alimentares são as embalagens. Um só produto pode estar associado a diversos tipos de embalagens, sendo que estas têm um importante papel na contenção, proteção, estética dos produtos e fornecimento de informação sobre os mesmos ao consumidor. Contudo, muitas da vezes, estas embalagens constituem um problema ambiental por serem a fonte de grandes volumes de resíduos não biodegradáveis.

De forma a diminuir o impacto ambiental causado pelas embalagens, minimizar a atividade fisiológica e proteger os produtos hortofrutícolas do desenvolvimento de microrganismos, podem ser aplicados revestimentos ou películas comestíveis e biodegradáveis.

Os revestimentos comestíveis constituem finas camadas de material, aplicadas sobre o alimento e que podem ser consumidas com o alimento. As películas são estruturas sólidas que resultam da secagem de uma solução filmogénica e podem ser utilizadas em substituição da embalagem tradicional. Ambos (revestimentos e

películas) não têm cheiro nem sabor e são biodegradáveis, servindo para controlar a perda de massa, trocas gasosas e processos de oxidação. Podem ser, ainda, adicionados ingredientes ativos nas matrizes das películas e revestimentos com capacidade de tornar o alimento mais seguro ou melhorar aspetos nutricionais e sensoriais.

De entre os materiais utilizados na produção de películas e revestimentos comestíveis encontram-se os hidrocolóides (polissacáridos e proteínas). Porém, estes materiais são hidrofílicos e com baixa resistência à água líquida e elevada permeabilidade ao vapor de água. De modo a contornar estas limitações têm sido estudadas várias estratégias, tais como a formação de barreiras compósitas por adição de um lípido e a promoção ligações cruzadas. No entanto, estas estratégias têm sido aplicadas essencialmente em estudos separados.

Assim, o objetivo geral deste trabalho consistiu em estudar o efeito da utilização simultânea de lípidos e de reações cruzadas no aumento da resistência à água de uma matriz hidrofílica composta por quitosano.

Para isso desenvolveram-se películas compósitas à base de quitosano utilizando: um óleo (ácido oleico) e uma cera (cera de abelha), e o tripolifosfato como agente reticulante.

Neste contexto foram estabelecidos dois delineamentos experimentais, um para o óleo e outro para a cera, onde se fez variar a percentagem de lípido adicionada assim como a percentagem de reticulante.

As películas foram caracterizadas em termos das suas propriedades higroscópicas (capacidade de absorção de água, solubilidade, permeabilidade ao vapor de água e isothermas de adsorção de água), aparência, cor, microestrutura e propriedades mecânicas.

2. Enquadramento teórico

2.1 Importância dos hortofrutícolas

Atualmente a importância de uma dieta equilibrada para manutenção da saúde e prevenção contra diversas doenças, é reconhecida mundialmente. Desta forma os produtos hortofrutícolas adquirem um papel essencial na alimentação. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) o baixo consumo de produtos hortofrutícolas é responsável por cerca de 2,8% das mortes mundiais prematuras, sendo considerado um dos dez maiores fatores de risco (OMS, 2003).

Segundo a nova roda dos alimentos o consumo destes alimentos deve constituir, aproximadamente 43% da alimentação diária, sendo que a OMS recomenda um consumo mínimo de 400 g diárias de forma a diminuir o risco de diversas doenças, tais como cardiovasculares, alguns tipos de cancros, diabetes e obesidade (OMS, 2003; Beirão-da-Costa, 2007).

Os hortofrutícolas, apesar da sua grande heterogeneidade em termos de composição, são considerados alimentos com grande qualidade nutricional por terem baixa densidade energética e serem ricos em vitaminas, sais minerais, fibras, compostos bioativos (Abreu, 2009; Agudo, 2005, Beirão-da-Costa, 2007; EuFIC, 2012). Para além das qualidades nutricionais, a aptidão comercial depende muito da qualidade microbiológica e organolética (Marques, 2012; Vilickova *et al.*, 2013).

2.2 Qualidade dos hortofrutícolas

A qualidade dos produtos hortofrutícolas é elaborada no campo a partir do conhecimento da variedade do produto em questão, condições edafo-climáticas, práticas agrícolas bem como o estado de maturação na colheita. Após a colheita, a qualidade dos produtos vai-se deteriorando e a perda de qualidade implica elevados prejuízos, pelo que os restantes intervenientes da cadeia alimentar têm como objetivo, através do manuseamento e utilização de técnicas adequadas, disponibilizar ao consumidor um produto com uma qualidade tão próxima do original quanto possível (Silva, 2000; Almeida, 2005).

Na área dos produtos frescos e minimamente processados um dos principais desafios é o da manutenção da qualidade, desde a colheita ao consumidor, minimizando as perdas devido a alterações fisiológicas e ação de microrganismos. Ao longo deste período, esta gama de produtos frescos, permanece metabolicamente ativa o que os torna muito perecíveis (Almeida, 2005; Vilickova *et al.*, 2013).

O mercado retalhista é o destino final dos produtos hortofrutícolas, sendo o único local onde o consumidor avalia todo o desempenho do processo e manuseamento antes e após a colheita. A decisão de compra por parte do consumidor baseia-se essencialmente na aparência e frescura e a sua repetição de características como sabor, aroma e textura (Almeida, 2005; Kader, 2007).

Existem diversos fatores condicionantes na manutenção da qualidade no período pós-colheita, muitos destes inerentes ao produto, outros, resultam como consequência da operação de colheita. Depois de colhidos, os tecidos vegetais ficam privados de água e nutrientes responsáveis por contrariar a senescência. Desta forma, o ambiente de transporte e armazenamento têm um papel importante na velocidade com que ocorre a deterioração dos hortofrutícolas (Early, 2002).

2.3 Fatores que afetam a qualidade dos produtos

2.3.1 Fatores inerentes ao produto

Os fatores inerentes ao produto, são todos aqueles que se encontram relacionados com o período de tempo antes da colheita. Como foi descrito acima, estes são essencialmente as condições edafo-climáticas, a disponibilidade de água no solo e as práticas agrícolas.

Para além de substâncias nutritivas, essenciais para o bom desenvolvimento do organismo, os hortofrutícolas podem conter uma série de fatores antinutricionais (oxalatos, glicosídeos cianogénicos ou glicosinolatos), ou seja, substâncias com a capacidade de interferir com a absorção de determinados nutrientes, podendo provocar danos à saúde do consumidor. Muitas vezes a forma de diminuir ou eliminar este tipo de substâncias passa por uma dieta variada e aplicação de algum tipo de processamento como fermentação, secagem ou cozedura (Benevides *et al.*, 2011; Moldão-Martins, 2012).

A segurança química e microbiológica constituem importantes fatores de segurança inerentes aos produtos. As situações de contaminação química dos hortofrutícolas encontram-se relacionadas, essencialmente com a utilização de produtos fitofarmacêuticos podendo, ainda, estarem relacionadas com a utilização de água de rega contaminada, problemas de poluição ambiental, ou substâncias tóxicas produzidas por microrganismos (Almeida, 2005; Moldão-Martins, 2012).

A contaminação microbiológica das frutas e vegetais é um fenómeno bastante frequente proveniente de fontes como o solo, água, animais, esgotos, fertilizantes

orgânicos, entre outros. Em HF podem observar-se microrganismos patogénicos ou de alteração (Moldão-Martins, 2012).

Segundo o relatório da ASEA de 2012, com dados relativos ao período de 1996 a 2006, a proliferação dos patogénicos (nomeadamente *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7 e norovírus) encontra-se sobretudo ao nível de alimentos previamente cortados e essencialmente em vegetais de folha verde. As frutas que originaram mais surtos pelo mundo foram as bagas, melões, meloas e melancias cuja contaminação se deve essencialmente à grande manipulação durante a colheita e transporte e à dificuldade de introdução de um processo de limpeza; as bagas por serem muito delicadas e as restantes por terem uma casca demasiado rugosa. Relativamente à proliferação, ao contrário dos vegetais, o baixo valor de pH das frutas contribui para diminuir a multiplicação e sobrevivência de bactérias patogénicas.

As alterações microbiológicas ocorridas em frutas diferem das ocorridas em hortícolas devido ao seu baixo valor de pH e elevado teor em açúcares simples. Desta forma, a microbiota predominante dos frutos (Tabela 1) são bolores e leveduras e nos vegetais bolores, leveduras e bactérias, responsáveis pela produção de diversas enzimas que contribuem para o processo degradativo dos tecidos vegetais. Geralmente, a deterioração microbiológica dos produtos não está relacionada com um microrganismo em particular, mas sim com uma ampla variedade destes seres. A carga excessiva destes organismos pode levar à acumulação de metabolitos secundários responsáveis por alterações no aroma, sabor e perda de firmeza (Oetterer *et al.*, 2006; Abreu, 2009).

Tabela 1 - Principais microrganismos responsáveis pela perda de qualidade nos Hortofrutícolas.

Adaptado de Abreu, 2009

Tipos de agentes microbianos	ESTIRPE	EFEITO
Bolores	<i>Alternaria, Aspergillus, Botrydiploia, Botrytis, Cladosporium, Collectotrichum, Diplodia, Diaporthe, Fusarium, Geotrichum, Gloeosporium, Monilia, Nigrospora, Penicillium, Phomopsis, Phytophthora, Rhizopus, Sclerotinia, Trichoderma</i>	Inutilização comercial.
Leveduras	<i>Saccharomyces, Pichia, Hanseniaspora, Candida, Torulopsis, Kloeckera, Rhodotorula.</i>	Invasão secundária dos tecidos infetados.
Bactérias lácticas	<i>Lactobacillus brevis, L. plantarum, Leuconostoc spp., L. mesenteroides, L. dextranicum, Streptococcus faecium, S. fecalis, Lactobacillus pastorianus, L. arabinosus, L. leichmanii, Microbacterium.</i>	Perda de firmeza dos tecidos e produção de produtos finais indesejáveis.
Bactérias de deterioração	<i>Pseudomonas, Enterobacter, Cryptococcus, Micrococci, Coryneforms.</i>	Perda de firmeza dos tecidos

2.3.2 Fatores fisiológicos

Os processos bioquímicos com mais influência na manutenção da qualidade nos produtos vegetais são a respiração, a perda de água por transpiração e a produção de etileno. Estes fenómenos metabólicos, apesar de essenciais para a manutenção das vidas destes tecidos, não devem ocorrer de forma excessiva pois levam a uma maior deterioração dos mesmos. A respiração e a perda de água são estimuladas por danos mecânicos, a ação de microrganismos, pragas e dependem muito das condições

atmosféricas como a temperatura, humidade relativa e composição atmosférica (Almeida, 2005; Silva *et al.*, 2000; Moldão-Martins, 2012).

O controlo da taxa respiratória é um parâmetro essencial para a conservação dos produtos: quanto mais intensa é a taxa respiratória, maiores e mais rápidas mudanças o produto sofre. A taxa respiratória é influenciada por vários fatores, como a temperatura, a composição atmosférica, a produção de etileno e o grau de processamento incrementado (Moldão-Martins *et al.*, 2000; Oetterer *et al.*, 2006).

O etileno é uma hormona de maturação, produzida por tecidos vegetais e alguns microrganismos. A produção de etileno depende da espécie/cultivar, do tipo de órgão e tecido e do estado de maturação, aumentando a produção à medida que a maturação avança. A produção de etileno, no período pós-colheita, pode ter efeitos desejáveis, tais como a aceleração e uniformização do desenvolvimento de alguns frutos, uniformização da cor em citrinos, entre outros. Os efeitos indesejáveis que podem ocorrer são a aceleração do amadurecimento e senescência precoce de tecidos vegetativos, o amolecimento de frutos, entre outros (Moldão-Martins *et al.*, 2000; Almeida, 2005).

A transpiração é um fenómeno fisiológico que consiste na libertação de água para a atmosfera envolvente. Quando os frutos e hortícolas se encontram ligados à planta, a reposição de água acontece de forma natural. Contudo, após a colheita, a transpiração continua a decorrer sem reposição de água. Este processo pode comprometer a qualidade e integridade dos frutos e hortícolas, pois leva à antecipação da maturação e senescência, à redução da massa e diminuição do período de vida útil (Almeida, 2005; Oetterer *et al.*, 2006).

2.3.3 Danos mecânicos

Ao longo da colheita, transporte e armazenamento dos HF podem ocorrer danos físicos de impacto, compressão e vibração, resultantes de quedas, excesso de pressão nos tecidos vegetais (comum em fruta e vegetais a granel), movimentação nos contentores ou linhas de seleção, entre outros. Os danos físicos para além de causarem *stress* nos HF, e induzem respostas metabólicas que levam ao aumento da perda de água e taxa respiratória, provocam lesões que permitem a entrada de microrganismos (Silva *et al.*, 2000; Almeida, 2005).

2.3.4 Fatores ambientais

Ao longo do período pós-colheita os fatores mais importantes a considerar para aumentar a longevidade dos produtos é o controlo da temperatura, humidade relativa e composição de atmosfera (Silva *et al.*, 2000).

A temperatura é um fator determinante na conservação dos tecidos vegetais. Temperaturas elevadas tendem a aumentar processos biológicos como a respiração, produção de etileno e a perda de água. A temperatura mais adequada ao longo de toda a cadeia depende do tipo de hortofrutícola, sendo que um bom controlo desta permite um atraso no processo de senescência e amadurecimento, reduzindo ainda a atividade microbiana, incluindo o desenvolvimento de doenças nos produtos HF e patogénicos para os humanos (Silva *et al.*, 2000; Almeida, 2005; Oetterer *et al.*, 2006).

A atividade da água (a_w) no interior dos tecidos vegetais é cerca de 100%, logo é essencial que a humidade relativa que se encontra em contato com os frutos e vegetais tenha valores elevados de forma a não provocar uma perda excessiva de água por transpiração (Silva *et al.*, 2000; Almeida, 2005; Oetterer *et al.*, 2006).

A redução dos níveis de oxigénio, abaixo de 8%, provoca a diminuição da taxa respiratória proporcionalmente à redução da concentração do oxigénio. Contudo, a partir de um determinado nível mínimo de oxigénio, dependendo do HF, ocorre respiração anaeróbia, resultando em sabor e odor desagradáveis.

A elevada concentração de dióxido de carbono reduz a taxa respiratória. A maioria dos frutos não tolera níveis de oxigénio abaixo de 2%. A tolerância relativa a dióxido de carbono varia de acordo com a espécie e cultivares (Oetterer *et al.*, 2006).

2.4 Embalagens

A embalagem alimentar surge como uma necessidade devido ao afastamento espacial e temporal entre a zona de produção e a de consumo dos bens alimentares.

A embalagem para os produtos hortofrutícolas constitui primordialmente uma proteção mecânica ao longo da cadeia de transporte, distribuição, armazenamento e venda. Contudo, atualmente as embalagens desempenham uma função importante na segurança e conservação dos frutos e hortícolas podendo ajudar a manter as suas características físicas, químicas, microbiológicas, organoléticas e prolongar o tempo de vida útil dos produtos (Castro *et al.*, 2003; Fonseca, 2012).

Apesar de todos os benefícios provenientes da utilização de embalagens, o impacto ambiental e gestão dos resíduos deixados pelas mesmas são uma preocupação crescente da indústria alimentar, distribuição, entidades reguladoras, grupos ambientais e consumidores. Uma das alternativas encontradas para a problemática ambiental é a utilização de materiais biodegradáveis (Castro *et al.*, 2003; Fonseca, 2012).

2.5 Revestimentos/Películas comestíveis

Os revestimentos comestíveis constituem finas camadas aplicadas na superfície dos produtos alimentares, constituindo uma barreira adicional à barreira natural dos produtos, podendo ser consumidas com os mesmos. Exisem ainda as películas comestíveis e/ou biodegradáveis, que são estruturas sólidas que resultam da secagem de uma solução filmogénica, e que podem ser utilizadas para embalar os produtos alimentares (Krochta, 2002; Marques, 2012; Moldão-Martins, 2012).

Na indústria alimentar recorre-se cada vez mais ao uso de revestimentos/películas comestíveis por diversos motivos, tais como (Lin *et al.*, 2007; Cerqueira, 2010; Marques, 2012; Moldão-Martins, 2012):

- Preservação do alimento;
- Proteção mecânica;
- Retenção de compostos voláteis do aroma;
- Estabilização de compostos da cor, valor nutricional ou outras características organoléticas;
- Proteção contra multiplicação ou contaminação microbiana;
- Servir de veículo para o transporte de aditivos alimentares, nutrientes ou compostos antimicrobianos;
- Barreira à transferência de massa (gases, água, lípidos ou outros solutos);
- Fácil produção;

Enquanto que os revestimentos/películas comestíveis apresentam efeitos desejáveis na manutenção do período de vida útil do produto, podendo ainda ajudar a manter as características dos frutos e vegetais (ou até mesmo melhorá-las, de forma a ser mais apelativo ao consumidor), podem apresentar igualmente algumas desvantagens, nomeadamente, a possível rejeição dos revestimentos por parte do consumidor, devido à preocupação com possíveis usos de aditivos. Em revestimentos/películas com elevada espessura ou elevadas propriedades de barreiras aos gases, produtos vivos como os hortofrutícolas, podem entrar em

respiração anaeróbica, levando ao desenvolvimento de sabores e odores estranhos. Para frutos e vegetais, a utilização de revestimentos com fracas propriedades de barreira ao vapor de água pode, conduzir a significativas perdas de massa, apesar de evitarem condensações que levam à proliferação de microrganismos (Sonti, 2003).

Em produtos hortofrutícolas é essencial garantir que existe uma permeabilidade controlada aos gases e vapor de água. É importante que o revestimento quando aplicado não mude de forma significativa a cor do produto e que não seja demasiado solúvel em água de forma a permanecer na superfície do produto o máximo de tempo possível.

2.6 Tipos de revestimentos/películas comestíveis

2.6.1 Hidrocoloidais

As películas e revestimentos hidrocoloidais são compostos principalmente por proteínas e polissacáridos, uma vez que estes possuem boas propriedades mecânicas e óticas. Contudo, são sensíveis à humidade e apresentam fracas propriedades de barreira ao vapor de água, o que se torna uma grande desvantagem para produtos hortofrutícolas devido ao seu alto teor de a_w , o que pode levar o revestimento a inchar ou dissolver-se quando entra em contato com a água (Guilbert *et al.*, 1996; Fonseca, 2012).

2.6.2 Lipídicos

A incorporação de componentes lipídicos, principalmente ceras ou óleos, em revestimentos e películas comestíveis contribui para melhorar as propriedades de barreira ao vapor de água, conseguindo minimizar as perdas de massa devido à sua baixa polaridade. Contudo, este tipo de películas na sua generalidade são opacas, relativamente duras, mais vulneráveis à oxidação, permeáveis ao oxigénio e constituem uma fraca proteção contra danos mecânicos (Kester *et al.*, 1986; Guilbert *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2002; Tanada-Palmu *et al.*, 2005)

O grupo dos lípidos inclui as ceras, acilgliceróis e ácidos gordos. Podem dividir-se em óleos e ceras, sendo que geralmente, as ceras, por se encontrarem no estado sólido, apresentam maior resistência a transferências de gases e vapor de água (Baldwin, 2007; Moldão-Martins, 2012).

2.6.3 Compósitos

Em ambos os tipos de películas acima descritos foram observadas funcionalidades e limitações, cujas características não permitem por si só obter um bom revestimento para produtos hortofrutícolas. O princípio básico das películas e revestimentos compósitos é unir na matriz filmogénica uma proteína ou polissacárido a um lípido de forma a conseguir melhores propriedades que permitam uma ação mais eficiente.

As proteínas e polissacáridos são hidrofílicos por natureza, o que os torna más barreiras ao vapor de água mas excelentes barreiras ao oxigénio e aromas. Contrariamente, os lípidos tem uma estrutura hidrofóbica, o que os torna uma boa barreira ao vapor de água. Contudo, a sua estrutura não polimérica limita a capacidade de formação de uma película coesa. Nas películas e revestimentos compósitos a proteína ou polissacárido fornece a integridade da película, aprisionando o lípido na sua matriz e confere uma boa barreira ao oxigénio enquanto o lípido fornece a sua capacidade de barreira ao vapor de água (Krochta *et al.*, 1997).

As películas ou revestimentos compósitos podem ser utilizados em bicamada ou emulsão. A bicamada é constituída por uma camada lipídica sobreposta a uma de polissacáridos ou proteínas, enquanto que nas emulsões os lípidos encontram-se dispersos e retidos na matriz formada pela proteína ou polissacárido. Nestas emulsões torna-se essencial o uso de um emulsionante ou tensioativo de forma a formar e estabilizar as emulsões (Kamper *et al.*, 1984; Callegarin *et al.*, 1997).

As propriedades destas películas e revestimentos são afetadas pela sua composição e a forma como os seus constituintes se encontram distribuídos ao longo da matriz (Kamper *et al.*, 1984; Callegarin *et al.*, 1997).

2.7 Quitosano

O quitosano ou poli (1-4)-2-amido-2-desoxi- β -D-glucose (Figura 1), é um polissacárido linear de carga global positiva que pode ser obtido a partir da desacetilação da quitina. A quitina (Figura 2) é o segundo polissacárido mais abundante no planeta, a seguir à celulose, encontrando-se naturalmente presente no exosqueleto dos crustáceos e na parede celular de alguns fungos e outros materiais biológicos (Devlieghere *et al.*, 2004; Baldwin, 2007; Vargas *et al.*, 2009; Aider, 2010; Elsabee *et al.*, 2013).

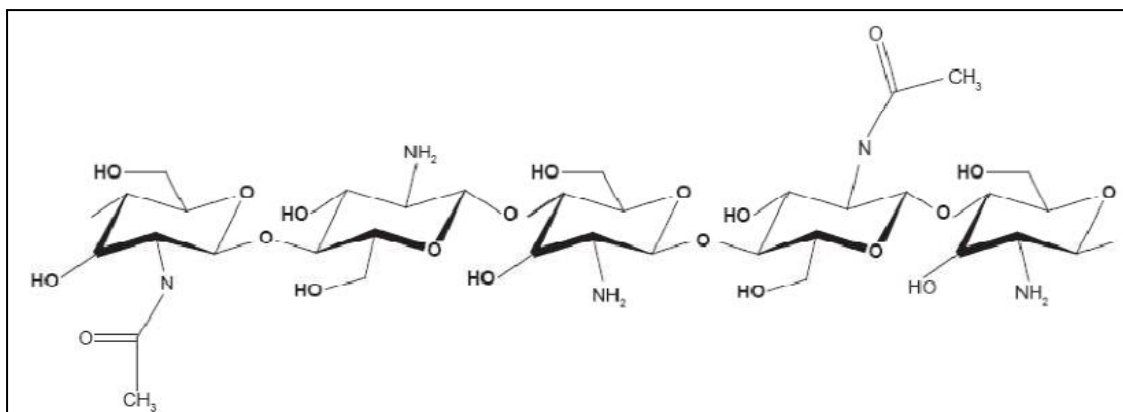


Figura 1: Estrutura química do quitosano
Fonte: Borgognoni *et al.*, 2006

Durante o processamento dos crustáceos, o seu exosqueleto constitui um resíduo abundante, que muitas vezes pode ser considerado um poluente, sendo que um dos grandes problemas desta indústria é o aproveitamento do mesmo. O fabrico de quitosano a partir da quitina ajuda assim a diminuir o impacto ambiental deste subproduto (Azevedo *et al.*, 2007; Marques, 2012).

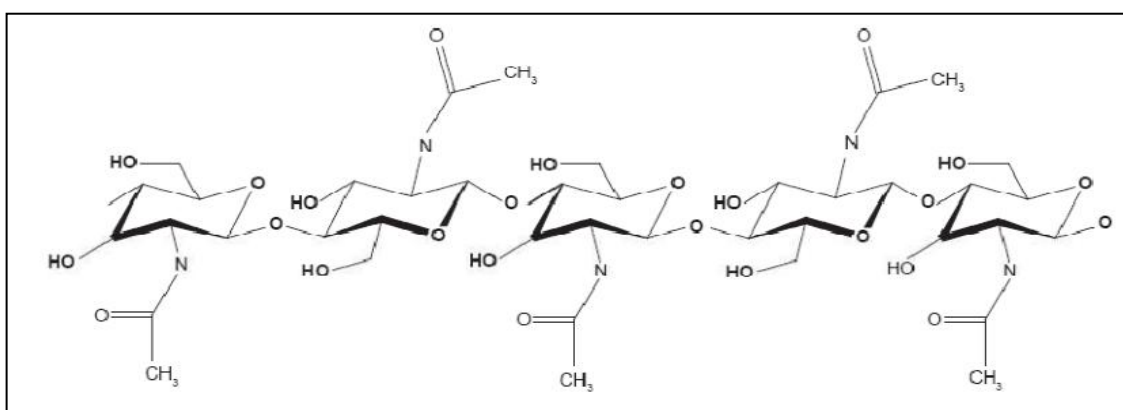


Figura 2: Estrutura química da quitina
Fonte: Borgognoni *et al.*, 2006

2.7.1 Produção de quitosano

O quitosano é obtido a partir do processo de desacetilação (Figura 3) da quitina, processo realizado com recurso a altas temperaturas e soluções alcalinas. Existem diferentes métodos de produção de quitosano. Um dos métodos mais comuns consiste em introduzir a quitina numa solução de hidróxido de sódio a 50% (p/v) com agitação mecânica e a uma temperatura entre 60-120°C durante 3 horas. De seguida procede-se a um arrefecimento durante 12 horas e uma filtração para remover proteínas e lípidos, repetindo-se todo o processo. No final o quitosano é lavado e seco numa estufa a 60°C (Singla *et al.*, 2001; Damian *et al.*, 2005; Cerqueira, 2010; Marques, 2012).

A operação de desacetilação raramente é completa; quando é obtido um grau de desacetilação mínimo de 50% o produto comercial já pode ser considerado quitosano (Damian *et al.*, 2005; Barros, 2008).

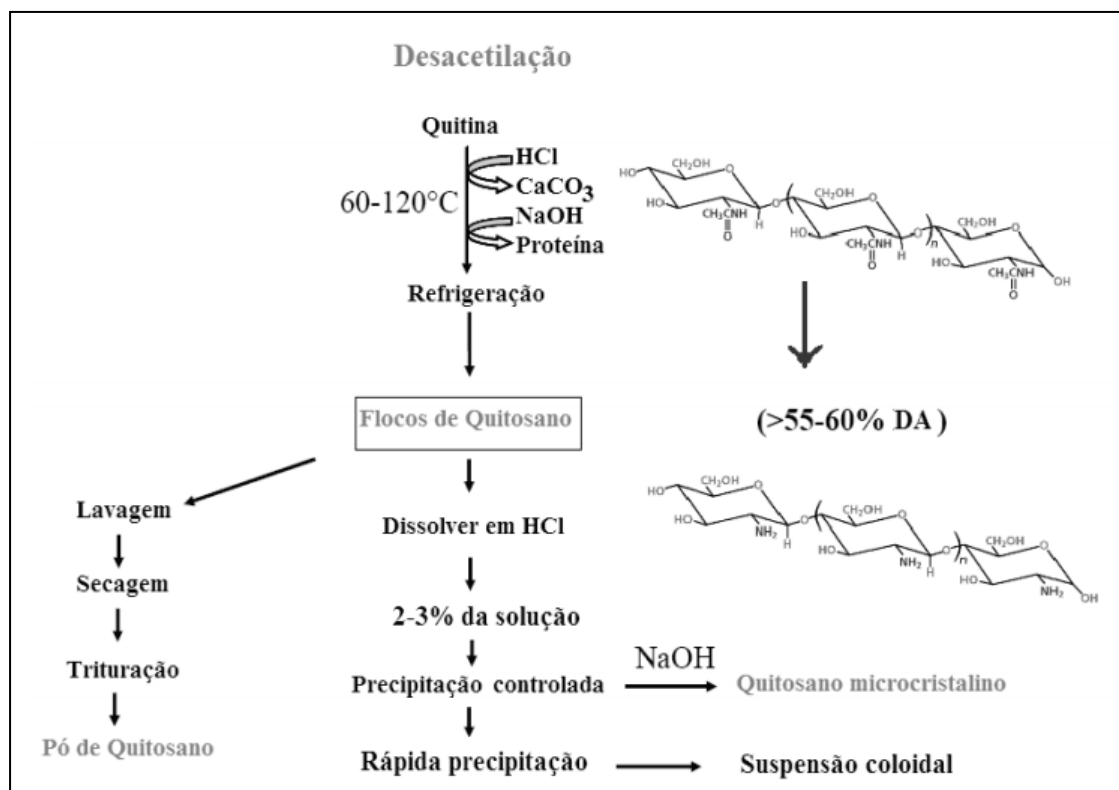


Figura 3: Representação esquemática do processo de desacetilação
Fonte: Barros, 2008

2.7.2 Propriedades do quitosano

O quitosano, cuja fórmula química é $(C_6H_{11}O_4N)_n$, consiste num polímero composto por unidades de N-acetil-glucosamina e glucosamina unidas entre si por ligações glicosídicas β (1→4) (Singla *et al.*, 2001; Gavhane *et al.*, 2013).

O quitosano é uma base fraca, sendo apenas solúvel em soluções aquosas diluídas de ácidos orgânicos ou inorgânicos que contenham um pH inferior a 6. Este fenómeno deve-se às propriedades hidrofílicas das unidades glucosaminas que adquirem uma carga positiva em meio com pH inferior a 6 (Sinha *et al.*, 2004; Azevedo *et al.*, 2007; Almeida, 2009; Dutta *et al.*, 2009).

O quitosano é normalmente descrito tendo em conta o grau de desacetilação e o seu peso molecular, uma vez que estas características influenciam as suas propriedades. Nas soluções filmogénicas torna-se importante ainda ter em conta o tamanho das partículas, densidade, viscosidade e outros possíveis constituintes adicionados à matriz e as condições ambientais (Devlieghere *et al.*, 2004).

O quitosano é um biopolímero biodegradável, biocompatível e biofuncional, não apresentando toxicidade para os humanos. Possui, ainda, propriedades antimicrobianas e antifúngicas, possivelmente resultante das interações entre as suas moléculas catiónicas com as cargas negativas presentes à superfície das células bacterianas. Todos estes benefícios faz com que o quitosano tenha grande aplicabilidade não só na indústria alimentar, como na farmacêutica, médica e agrícola (Devlieghere *et al.*, 2004; Aider, 2009; Cerqueira, 2010).

A excelente capacidade do quitosano de formar películas torna este material num bom constituinte para a formulação de revestimentos comestíveis, capazes de prolongar a vida útil dos produtos alimentares. As películas e revestimentos de quitosano apresentam uma permeabilidade seletiva aos gases CO₂ e O₂ e boas propriedades mecânicas. Contudo, são altamente permeáveis ao vapor de água, e apesar de apresentarem boas propriedades mecânicas originam películas demasiado rígidas e difíceis de manobrar. De forma a melhorar todas estas propriedades indesejáveis, é possível adicionar outros compostos como plastificantes de forma a tornar o filme mais maleável; lípidos e tensioativos para melhorar a barreira ao vapor de água (Vargas *et al.*, 2009).

O quitosano é insolúvel em água. Contudo, quando os grupos amina se encontram protonados (o que acontece em meio ácido) vai dar-se uma maior solvatação em água, fenómeno indesejável pois leva a uma dissolução do revestimento comestível. Desta forma torna-se essencial adicionar um reticulante que forma ligações com estes grupos tornando a matriz mais rígida e difícil de penetrar (Fonseca, 2012).

3. Materiais e Métodos

3.1 Preparação das películas

Este trabalho tem dois objetivos principais: estudar a influência de diferentes concentrações de lípido e reticulante, nas propriedades de películas compósitas de quitosano e, comparar películas compósitas de quitosano com dois tipos de lípidos diferentes, ácido oleico e cera de abelha. Para tal prepararam-se várias películas de ácido oleico e cera de abelha com as mesmas condições, onde varia apenas o tipo de lípido usado, a percentagem do mesmo e a quantidade de reticulante utilizada. A matriz de todos os ensaios é composta por uma base de quitosano, glicerol (plastificante), *tween 80* (emulsionante) e lípido na mesma quantidade. A operação de reticulação é realizada por imersão das películas obtidas por secagem da solução filmogénica numa solução aquosa de tripolifosfato de concentração conhecida.

3.1.1 Delineamento experimental

A influência da concentração do lípido (ácido oleico ou cera de abelha) e agente reticulante nas películas será avaliada por metodologias de delineamento composto central rotacional (DCCR), para duas variáveis independentes, com as seguintes concentrações:

a) 0%, 6%, 20%, 34% e 40% (m/m) de ácido oleico/ cera de abelha (em relação ao quitosano);

b) 0%, 0,73%, 2,5%, 4,3% e 5% (m/v) de tripolifosfato.

Este delineamento é composto por 4 pontos fatoriais, 4 pontos axiais e 4 pontos centrais, totalizando 12 ensaios. Os dois fatores independentes são estudados em cinco níveis diferentes (-1.41421, -1, 0, +1, +1.41421), apresentados na Tabela 2. As concentrações de ácido oleico/cera de abelha e tripolifosfato a ser utilizadas para a formulação dos tratamentos são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 2: Níveis utilizados no DCCR para as variáveis de conteúdo lipídico (ácido oleico/cera de abelha) e agente reticulante (tripolifosfato)

Variáveis	Níveis				
	-1.41421	-1	0	+1	+1.41421
Ácido oleico ou cera de abelha (%m/m)	0	6	20	34	40
Tripolifosfato (%m/v)	0	0.73	2.5	4.3	5

Tabela 3: Delineamento fatorial completo para a composição dos películas

Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis Reais	
	X1	X2	% m/m de ácido oleico ou cera de abelha	% m/v TPP
7 (C)	0	0	20	2.5
1	-1	-1	6	0.73
5 (C)	0	0	20	2.5
12 (C)	0	0	20	2.5
8	-1.41421	0	0	2.5
10	0	-1.41421	20	0
11	0	1.41421	20	5
4	1	1	34	4.3
3	1	-1	34	0.73
9	1.41421	0	40	2.5
6 (C)	0	0	20	2.5
2	-1	1	6	4.3

O Modelo de Superfície de Resposta será utilizado para o estudo da avaliação simultânea das duas variáveis independentes. As diferentes respostas serão analisadas usando uma função polinomial de segunda ordem (Equação 1).

$$Y_n = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{12}X_1X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 \quad (1)$$

Onde b_n são os parâmetros do modelo, Y_n é a variável dependente e X_k são as variáveis independentes. Este modelo será ajustado aos pontos experimentais e o nível de significância do modelo será analisado por meio dos coeficientes de correlação e pelo *p-value*.

Neste estudo as variáveis dependentes consideradas foram a solubilidade e capacidade de absorção de água, permeabilidade ao vapor de água e adsorção de vapor água a transparência e propriedades mecânicas (testes de extensão e perfuração).

3.1.2 Preparação da solução filmogénica de quitosano

Neste trabalho foram analisados dois tipos de lípidos diferentes: ácido oleico e cera de abelha, dando assim, origem a duas classes de películas diferentes cada uma com todos os 12 ensaios apresentados no delineamento fatorial da Tabela 3. Inicialmente foram preparadas as películas de óleo e posteriormente as de cera. A ordem com que cada um dos ensaios foi feito segue a ordem aleatória do delineamento fatorial dado pelo delineamento experimental.

A solução filmogénica de quitosano tem como base uma matriz de quitosano e glicerol. A preparação desta solução-mãe é idêntica em ambos os tipos de películas, diferindo nas fases posteriores.

O quitosano é insolúvel em água, pelo que foi dissolvido numa solução de ácido acético a 1%. O polímero foi dissolvido nesta solução com uma concentração de 1,5 % (m/v) e foi adicionado 50 % (m/m) de glicerol, em relação à massa do quitosano. Esta solução ficou 18 horas agitar a cerca de 500 rpm num agitador de pás (Eurostardigital, IKA, LABORTECHNIK, Alemanha), à temperatura ambiente. Posteriormente, a solução foi colocada numa câmara frigorífica durante um dia para repouso de forma a perder algumas bolhas de ar incorporadas durante a agitação.

3.1.3 Películas compósitas de ácido oleico

As películas compósitas de óleo tiveram como base a solução-mãe de quitosano preparada inicialmente, fazendo variar a quantidade de ácido oleico e tripolifosfato.

Inicialmente foi adicionado, a um gobelé, o *tween* 80, com uma função emulsionante, e a solução-mãe de quitosano. A quantidade de *tween* 80 foi sempre

igual à quantidade de óleo, sendo 0%, 6%, 20%, 34% ou 40% da massa de quitosano presente na solução filmogénica que se pretendia preparar.

A mistura inicial foi agitada à temperatura ambiente, no ultra-turrax (T25basic, IKA, LABORTECHNIK, Alemanha) a 13500 rpm durante 4 minutos (adaptado de Vargas *et al*, 2009; Velickova *et al*, 2013). De seguida foi acrescentado o ácido oleico e a solução é novamente agitada nas mesmas condições de forma a obter-se uma emulsão. A solução filmogénica foi deixada a repousar à temperatura ambiente durante 3 horas para perder as bolhas de ar que se formaram na etapa anterior. Após este período, a emulsão foi transferida para caixas de acrílico. Estas caixas possuem uma área total de aproximadamente 406 cm², encontrando-se divididas em quatro partes semelhantes de forma a obter uma secagem mais uniforme e limitar a possível formação de bolhas de ar. A distribuição da solução de revestimento foi feita mantendo um rácio de 0,35 g/ cm². A solução filmogénica foi colocada numa estufa para secar a uma temperatura de 40° C e uma circulação de ar durante 72 horas (adaptado de Vargas *et al*, 2009; Velickova *et al*, 2013).

No fim da secagem, cada filme foi mergulhado numa solução de tripolifosfato de forma a proceder-se à reticulação. Esta solução foi preparada com água destilada e tripolifosfato, ficando três horas a agitar com um agitador de pás (Eurostardigital, IKA, LABORTECHNIK, Alemanha). A percentagem de tripolifosfato variou entre 0%, 0,73%, 2,5%, 4,3% e 5% (m/v).

Cada filme ficou submerso durante um minuto e de seguida foi colocado a secar na estufa a uma temperatura de 40° C, com circulação de ar durante três horas. Após a secagem as películas foram cortadas em quadrados, retângulos e círculos de forma a facilitar os ensaios. Cada uma das amostras foi devidamente identificada (Figura 4) e colocada no exsicador para estabilizar à temperatura ambiente e a uma humidade relativa de 50%, durante 72 horas (adaptado de Vargas *et al*, 2009; Velickova *et al*, 2013).

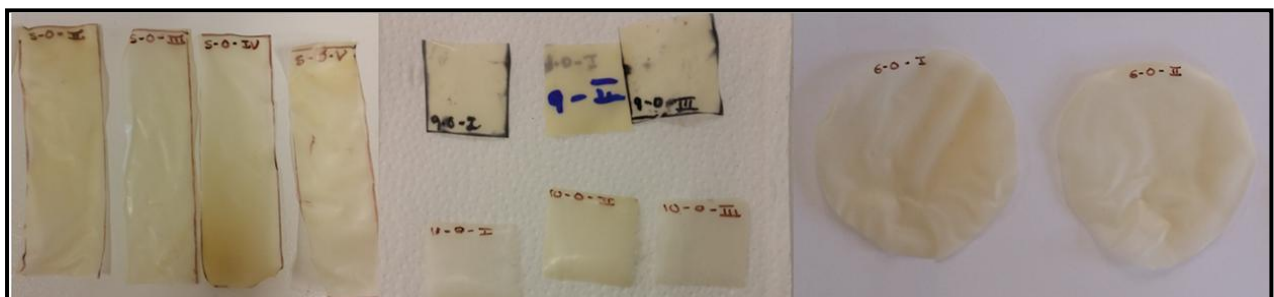


Figura 4: Diferentes formas geométricas, das películas, necessárias para a realização dos testes

3.1.4 Películas compósitas de cera de abelha

As películas compósitas de cera tinham como base a solução-mãe de quitosano preparada inicialmente, fazendo variar a quantidade de cera de abelha e tripolifosfato.

Inicialmente foi adicionado a um gobelé, o *tween 80*, com uma função emulsionante, e a solução-mãe de quitosano. A quantidade de *tween 80* foi sempre igual à quantidade de cera, sendo 0%, 6%, 20%, 34% ou 40% da massa de quitosano presente na solução filmogénica que se pretendia preparar. A cera de abelha encontra-se no estado sólido à temperatura ambiente, fundindo a 65°C. Por este motivo a mistura inicial foi mantida numa placa de aquecimento com baixa agitação magnética até que se atingisse uma temperatura de 70° C, para garantir que toda a solução se encontrava acima dos 65°C. Ao verificar-se a temperatura pretendida, foi adicionada a cera de abelha e aumentada a agitação para fundir a cera. Quando a cera de abelha se encontrava no estado líquido a mistura foi agitada no ultra-turrax (T25basic, IKA, LABORTECHNIK, Alemanha) a 13500 rpm durante quatro minutos (adaptado de Vargas *et al*, 2009; Velickova *et al*, 2013).

Quando o processo de emulsificação foi concluído era necessário remover as bolhas de ar incorporadas durante a agitação. Nestas soluções filmogénicas não é possível recorrer ao repouso. Uma vez que estes revestimentos no estado líquido tinham de permanecer sempre a uma temperatura superior a 65°C, para que a cera não solidificasse, o repouso provocaria uma evaporação excessiva. Por este motivo, nas soluções de cera, optou-se por fazer mais gobelés com menor quantidade de solução e foi utilizada uma estufa de vácuo (Heraeus INSTRUMENTS, Alemanha) com uma bomba de vácuo (SASKIA Hochvakuum-und Labortechnik GmbH, Alemanha) no final do processo durante um tempo nunca superior a dez minutos para não *comprometer* a homogeneidade da solução.

As etapas de secagem, reticulação e preparação das amostras ocorrem de forma idêntica à das películas compósitas de ácido oleico.

3.2 Aparência das películas

A aparência das películas foi analisada a partir da determinação da espessura, da cor e transparência.

3.2.1 Medição da espessura das películas

A espessura das películas foi medida antes dos testes de perfuração, extensão e permeabilidade para cada uma réplicas de cada ensaio com um micrómetro digital (Digimatic Micrometer, Mitutoyo, Japão).

3.2.2 Medição da cor e transparência

Para a medição da cor foi utilizado o colorímetro Chroma Meter CR-400 da Konica Minolta, Inc. (Japão), de forma a obter os parâmetros da cor (L^* , a^* e b^*).

Foram realizadas medições da cor a 4 cartolinas de cores diferentes (branco, verde, amarelo e vermelho) e de seguida voltaram-se a medir a cor das mesmas com as amostras das películas obtidas sobrepostas.

Todas as medições foram realizadas nas mesmas condições de luminosidade (luz artificial). Antes de se efetuarem as leituras o colorímetro foi calibrado com um padrão branco ($L^* = 94,62$, $a^* = -0,53$ e $b^* = 3,64$). Foram efetuadas 3 leituras para cada amostra de película.

O modelo utilizado neste ensaio foi o CIEL*a*b* que se baseia num modelo inicialmente proposto pela Comissão Internacional d'Eclairage, em 1931, cuja escala assenta na Teoria das Cores Opostas. Neste modelo a cor é representada tridimensionalmente (Figura 5) a partir de um gráfico de coordenadas x,y e z relativas ao parâmetros a^* , b^* e L^* , respetivamente. O a^* representa a variação de cor entre o verde ao vermelho e o b^* a variação de cor entre o azul e amarelo, apresentando ambos, valores compreendidos no intervalo que vai desde -60 a +60. O L^* define a luminosidade e varia entre 0 (preto) e 100 (branco) e o ponto central corresponde a cor cinzento (Gonçalves, 2007; Fonseca, 2012).

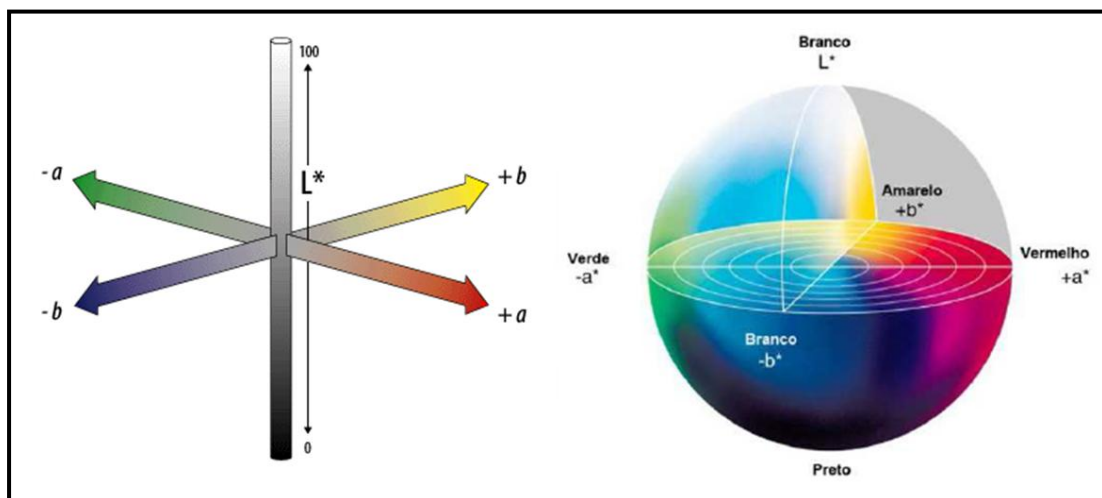


Figura 5: Representação esquemática do método CIELAB
Fonte: Adobe Technical Guides; Fonseca, 2012

As variações da cor, ΔE , foram calculadas a partir da diferença entre o L^* , a^* e b^* entre duas cores (a cor das cartolinas com e sem o filme sobreposto), Equação 2.

$$\Delta E = [(\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2 + (\Delta L^*)^2]^{1/2} \quad (2)$$

3.2.3 Microscopia

A microscopia é uma técnica que permite analisar a microestrutura das amostras, assim como identificar defeitos e impurezas. Para esta determinação não foi possível analisar todas as amostras por falta de recursos pelo que foram escolhidos os 4 pontos axiais e um ponto central do delineamento experimental, tanto para as películas de ácido oleico como para as de cera de abelha.

A microestrutura das películas foi observada a partir da técnica de Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM) que possibilita obter imagens idênticas às que se obteriam por microscopia ótica de reflexão, mas numa gama de reflexão superior e com maior profundidade de campo, permitindo uma análise semi-quantitativa dos elementos químicos na superfície dos materiais (De Sá, 1994; Duarte, 2010).

As amostras das películas foram mergulhadas em nitrogénio líquido para serem fraturadas enquanto estavam criocongeladas, preservando assim a estrutura na zona da fratura para a análise (Bonilla *et al.*, 2011; De Sá, 1994; Duarte, 2010).

O princípio de funcionamento da SEM baseia-se na incidência de um feixe de eletrões, sob vácuo, num ponto da superfície da película, e a subsequente recolha dos eletrões emitidos. Para esta técnica ser possível, é necessário que a amostra apresente uma boa condutividade elétrica superficial. Por esta razão, foi aplicado um revestimento ultrafino composto por partículas de ouro (De Sá, 1994; Duarte, 2010).

Devido ao fato de a superfície das placas onde as soluções filmogénicas secam ter algumas irregularidades, e destas se traduzirem na superfície do filme que secou em contato com as placas, este procedimento foi realizado na face das amostras que secou em contato com o ar, para eliminar esses defeitos nas imagens.

A morfologia das películas foi avaliada a partir de um microscópio eletrônico FEG-SEM JEOL JSM/001F de Oxford com auxílio do sistema JEOL software PC-SEM. As amostras foram revestidas utilizando o equipamento Quorum Technologies, Q150TES de forma a observar melhor a superfície e secção de corte das amostras.

3.3 Propriedades higroscópicas

3.3.1 Capacidade de absorção de água e solubilidade

Para determinar a capacidade de absorção de água e a solubilidade foram analisadas três réplicas de cada um dos ensaios do delineamento experimental para ambas as películas compósitas. As amostras consistiam em quadrados com 20 mm de lado e devidamente identificados.

Para esta análise, cada uma das réplicas das películas produzidas foi seca numa estufa de vácuo, a 45°C, durante 15 horas. Depois de pesadas, as amostras foram colocadas individualmente num copo com 70 ml de água destilada, ficando nestas condições durante 8 horas. Esgotado esse tempo, recolheram-se as amostras e retirou-se o excesso de água com papel absorvente para serem novamente pesadas (adaptado de Cordeiro, 2010).

Cada uma das amostras foi colocada novamente, a secar numa estufa a 60°C, (adptado de Cordeiro, 2010) com circulação de ar, durante 15 horas, para remover a água absorvida. No fim deste tempo foram novamente pesadas sendo possível calcular a capacidade de absorção (Equação 3) e a solubilidade (Equação 4).

$$\text{Capacidade de absorção} = \frac{m_2 - m_3}{m_3} \quad (3) \qquad \text{Solubilidade} = \frac{m_1 - m_3}{m_1} \quad (4)$$

Onde:

m_1 – Massa inicial

m_2 - Massa após a imersão

m_3 - Massa após a secagem final

3.3.2 Isotermas de adsorção

As isotermas de adsorção de água foram determinadas pelo método gravimétrico à temperatura ambiente.

Para este ensaio foram analisadas três réplicas apenas das amostras correspondentes aos ensaios 8, 9, 10 e 11 e um dos ensaios centrais para ambas as películas compósitas de quitosano. Prepararam-se nove soluções salinas saturadas de forma a obter nove ambientes com diferentes valores de atividade da água (a_w).

Foram preparadas soluções saturadas dos sais de cloreto de lítio, cloreto de magnésio hexa-hidratado, nitrato de magnésio hexa-hidratado, nitrito de sódio, cloreto de sódio, brometo de potássio, cloreto de potássio, cloreto de bário di-hidratado, nitrato de potássio cujo valores de atividade (a_w) são, respetivamente, 0.112, 0.332, 0.534, 0.643, 0.753, 0.809, 0.843, 0.901, 0.936. (Lang *et al.*, 1981)

Cada uma das amostras de cada película (quadrados com aproximadamente 20 mm de lado), devidamente identificadas, foram secas numa estufa de vácuo a 45° C durante 19h e pesadas em seguida, de forma a determinar a massa seca. Posteriormente, ficaram 3 semanas fechadas em câmaras com as soluções salinas saturadas anteriormente preparadas, para atingir o equilíbrio. No fim das 3 semanas as amostras foram pesadas novamente para determinar a quantidade de água adsorvida.

Para a obtenção das isotermas de adsorção procedeu-se à representação da massa de água adsorvida no equilíbrio por massa de sólido seco em função da atividade da água a que as películas estiveram sujeitas. Para este ajuste foi utilizado um modelo de Oswin, cuja equação é a seguinte:

$$X = C \left(\frac{a_w}{1-a_w} \right)^K \quad (5)$$

Onde:

X: Massa de água por massa de sólido seco no equilíbrio (g H₂O/ g sólido seco)

a_w : Atividade da água;

K: Constante de ajuste do modelo de Oswin;

C: Constante de ajuste do modelo de Oswin.

3.3.3 Permeabilidade ao vapor de água

O teste de permeabilidade ao vapor de água foi determinado gravimetricamente.

Prepararam-se 3 réplicas circulares, de cada um dos ensaios do desenho de experiências, com cerca de 60 mm de diâmetro. Após o período de estabilização, as amostras foram colocadas sobre caixas de vidro circulares (com 50 mm de diâmetro) e seladas com silicone no topo da caixa, com sobreposição de uma tampa de vidro aberta na zona central. As caixas de vidro continham 9 mL de uma solução salina saturada de brometo de potássio, KBR, (a_w = 0.809).

As caixas de vidro com as amostras foram colocadas no interior de um exsiccador com uma solução salina saturada de nitrato de magnésio hexa-hidratado, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, ($a_w = 0,534$), e previamente equipado com uma ventoinha, para promover a circulação de ar, minimizando a resistência à transferência de massa acima da película, e uma sonda com capacidade de medir a humidade relativa e temperatura, Figura 6 (Alves *et al.*, 2010).

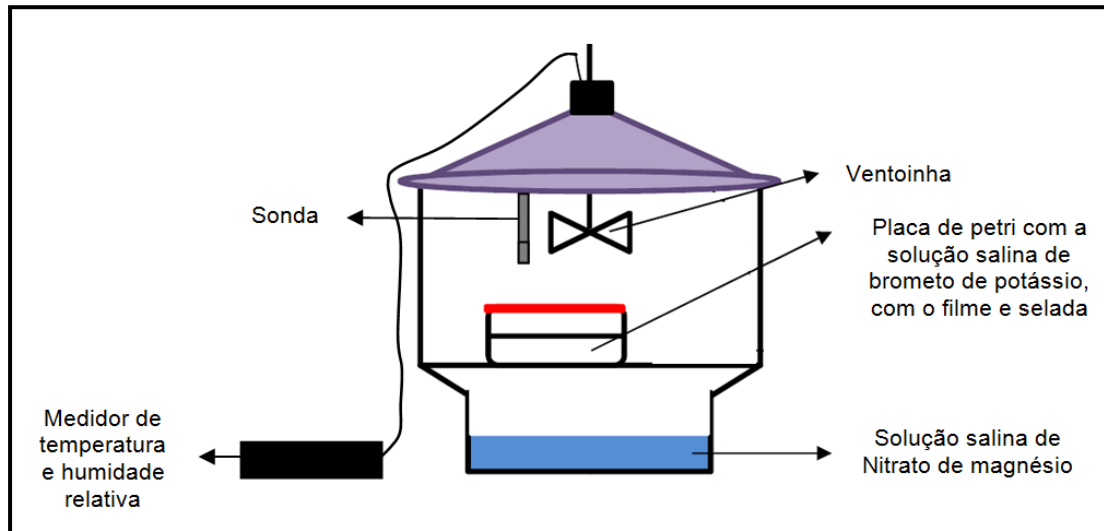


Figura 6: Representação esquemática do teste da permeabilidade

Durante 1 dia, as amostras foram pesadas seis vezes com intervalos de cerca de 2 horas entre as pesagens.

A permeabilidade ao vapor de água é calculada a partir do declive da reta de regressão linear da perda de peso em função do tempo, dada pela Equação 6 (Alves *et al.*, 2010):

$$WVP = \frac{N_{wf} \times \delta}{\Delta P} \quad (6)$$

Onde:

WVP: Permeabilidade ao vapor de água ($\text{mol} \cdot \text{m} / \text{m}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{Pa}$)

N_{wf} : Fluxo molar de vapor de água através do filme, medido experimentalmente, ($\text{mol} / \text{m}^2 \cdot \text{s}$)

δ : Espessura do filme (m)

ΔP : Força motriz efetiva, expressa como diferença de pressão de vapor de água em ambos os lados do filme (Pa)

O percurso do vapor de água ao longo deste ensaio, encontra-se ilustrado na Figura 7.

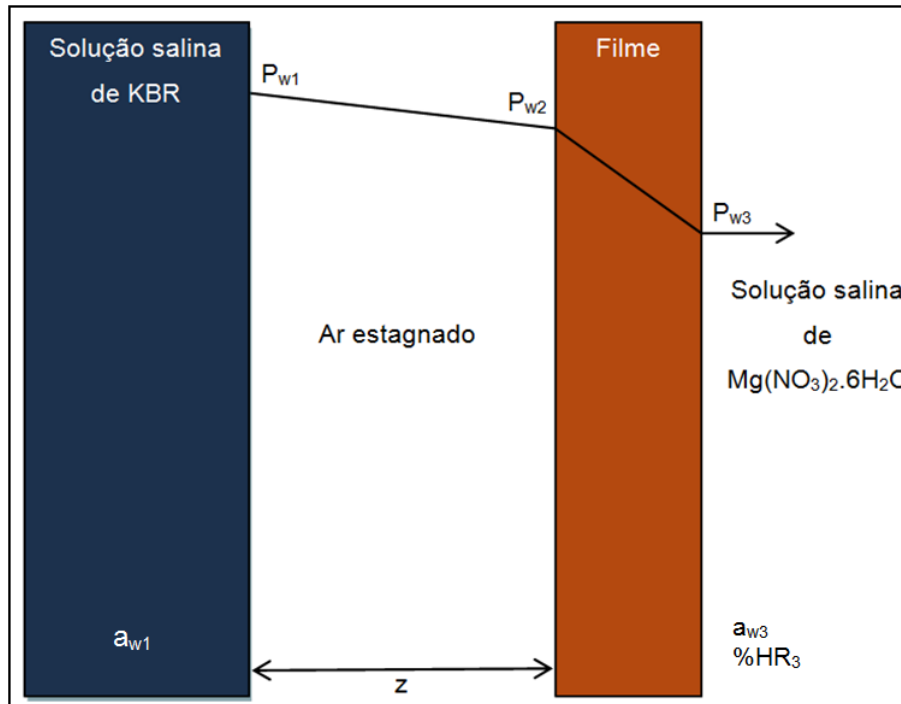


Figura 7: Representação esquemática do processo de transporte do vapor de água através do filme

Para o cálculo da permeabilidade ao vapor de água (Equação 10) torna-se imperativo a determinação da pressão parcial de vapor de água em contato com o filme, P_{w2} , e a pressão parcial de vapor de água que se encontra no exsicador, P_{w3} , (Alves *et al.*, 2010).

Tendo em conta que, no estado estacionário, o fluxo de água medido é igual ao fluxo de água através do ar estagnado, é possível calcular P_{w2} a partir da Equação 7.

$$N_w = \frac{P}{RTz} D_{w-ais} \ln \left(\frac{P - P_{w2}}{P - P_{w1}} \right) \quad (7)$$

Onde:

N_w : Fluxo de água ($\text{mol/m}^2\text{s}$)

P : Pressão atmosférica (Pa)

R : Constante dos gases perfeitos ($\text{J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$)

T: Temperatura (K)

z: Distância entre o filme e a solução (m)

D_{w-air} : Coeficiente de difusão de vapor de água em ar (m^2/s)

P_{w1} : Pressão parcial de vapor de água em contato com a solução do filme (Pa)

A pressão parcial de vapor de água em contato com a solução salina de brometo de potássio, P_{w1} , é determinada da seguinte forma:

$$P_{w1} = a_w \times P_w^* \quad (8)$$

Onde:

a_w : Atividade da água

P_w^* : Pressão de vapor de água pura (Pa), dada pela Equação 9.

$$P_w^* = \exp \left[23,2 - \frac{3816,4}{T - 46,1} \right] \quad (9)$$

Onde:

P_w^* : Pressão de vapor de água pura (Pa)

T: Temperatura (K)

A pressão parcial no exsicador, P_{w3} , é calculada pela Equação 10, a partir da humidade relativa média durante o ensaio (Alves *et al.*, 2010).

$$\%HR = \frac{P_{w3}}{P_w^*} \times 100 \quad (10)$$

3.4 Propriedades mecânicas

3.4.1 Testes de extensão

Para este ensaio prepararam-se 5 réplicas de cada uma das formulações previstas pelo delineamento experimental, com 20 x 70 mm.

Após o período de estabilização descrito na preparação das películas, as amostras foram analisadas num texturómetro (TA-XT2 , Stable Micro Systems, UK) com uma força máxima de 35 kg. Estas amostras foram fixadas pelas extremidades numa sonda de gancho de tração e estendidas até à rutura, a uma velocidade constante de 0,5 mm/s.

Uma vez concluído o ensaio, obtém-se, graficamente, a força exercida em função da distância e do tempo, o que permite calcular a tensão na rutura (σ), a deformação na rutura (%), e o módulo de *Young* (E).

A tensão de rutura é a força exercida sobre a área da seção reta da película, no momento em que este se quebra e pode ser calculada pela Equação 11:

$$\sigma = \frac{F}{S} \quad (11)$$

Onde:

σ : Tensão na rutura (N/m²)

F: Força na rutura (N)

S: Área da seção reta da película (m²)

A deformação na rutura é um parâmetro que indica a flexibilidade e elasticidade da película e é expressa como a percentagem da variação do comprimento da amostra em relação ao seu comprimento inicial. Determina-se pelo alongamento no momento em que a película quebra, em relação ao seu comprimento inicial, como se pode observar na Equação 12.

$$\varepsilon = \frac{l_f - l_i}{l_i} \quad (12)$$

Onde:

ε : Deformação na rutura

l_f : Alongamento final (mm)

l_i : Alongamento inicial (mm)

O módulo de *Young* indica-nos a resistência da película à deformação. Valores elevados do módulo de *Young* significam que é necessária uma tensão elevada para provocar uma determinada deformação, sendo obtido pela Equação 13:

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} \quad (13)$$

Onde:

E: Módulo de *Young* (N/m²)

σ : Tensão na rutura (N/m²)

ε : Deformação na rutura

Neste estudo o módulo de Young foi obtido a partir das curvas de tensão em função da deformação.

3.4.2 Testes de perfuração

Para este ensaio prepararam-se 3 réplicas de cada uma das formulações previstas pelo desenho experimental, com 20 x 20 mm.

Após o período de estabilização, as amostras foram analisadas no mesmo texturómetro, do teste anterior, mas com uma célula de carga com força máxima de 5 kg. Foi montada uma plataforma com um orifício (com 10 mm de diâmetro) e uma sonda de *inox* com 2 mm de diâmetro. As amostras foram fixadas na plataforma sobre o orifício e pressionadas na zona central pela sonda, a uma velocidade constante de 1 mm/s, até perfurar a película.

A partir deste teste obtém-se a força exercida para perfurar a película em função da distância percorrida e do tempo. Pela leitura dos gráficos é possível determinar a força de perfuração e a partir desta, a tensão de perfuração (tensão necessária para perfurar a película) e a deformação na perfuração.

$$\sigma_p = \frac{F_p}{S} \quad (14)$$

Onde:

σ_p : Tensão na perfuração (N/m²)

F_p : Força na perfuração (N)

S : Área da seção reta da película (m^2)

A deformação na perfuração é dada pela seguinte equação:

$$\varepsilon = \frac{L - L_i}{L_i} \quad (15)$$

Onde:

ε : Deformação na rutura

L : Alongamento na perfuração (mm)

L_i : Alongamento inicial (mm)

Para o cálculo do alongamento na perfuração recorre-se ao esquema representado na Figura 8, onde o alongamento na perfuração constitui a hipotenusa obtida a partir da soma do alongamento inicial (L_i) com o final (L_f).

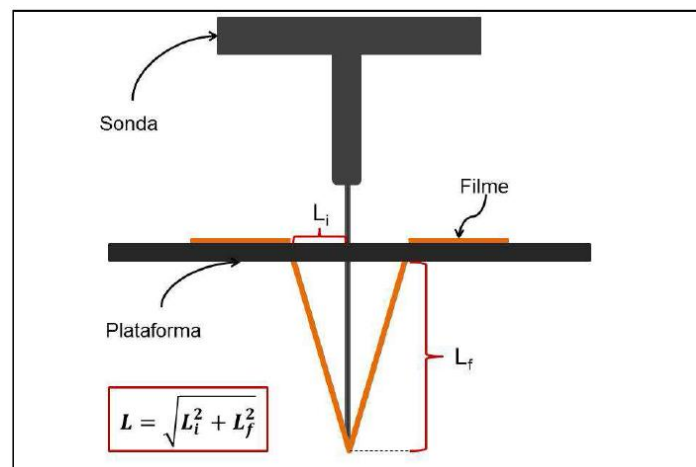


Figura 8: Representação esquemática do teste da perfuração

3.5 Análise estatística

O tratamento estatístico dos resultados foi feito com recurso ao programa Statsoft Statistica v7.0.6.1.0 EN, por comparação dos valores obtidos em cada determinação, para os doze ensaios de ácido oleico e para os de cera, sendo que não foi utilizado o software para comparar resultados de películas compósitas com lípidos diferentes a partir de uma ANOVA a 2 fatores. Quando o ajustamento para

ambos os tipos de películas não era adequado foi realizada uma comparação de médias com uma ANOVA a 1 fator.

Na estudo das isotermas foi utilizado o software Scientist, de forma a obter os parâmetros necessários para a equação de Oswin.

4. Apresentação dos resultados e discussão

4.1 Aparência das películas

Todas as películas de óleo e cera, antes da aplicação do reticulante (Figura 9), apresentavam uma aparência similar; eram películas transparentes e com uma coloração amarelada, sendo a cor mais intensa nas películas com maior percentagem de lípido. Contudo nas películas de cera havia uma menor homogeneidade e uma cor amarelada mais proeminente, devido ao fato da cera ter uma cor amarela e ser difícil de emulsionar (Figura 10).

Após a aplicação do TPP, as películas ficaram muito mais enrugadas e rígidas. As películas com uma percentagem maior de TPP ficaram mais rígidas e mais difíceis de manusear. Porém, verificou-se que para a mesma concentração de TPP, uma percentagem de lípido mais elevada ajudava a diminuir esta rigidez e a tornar o material mais maleável.

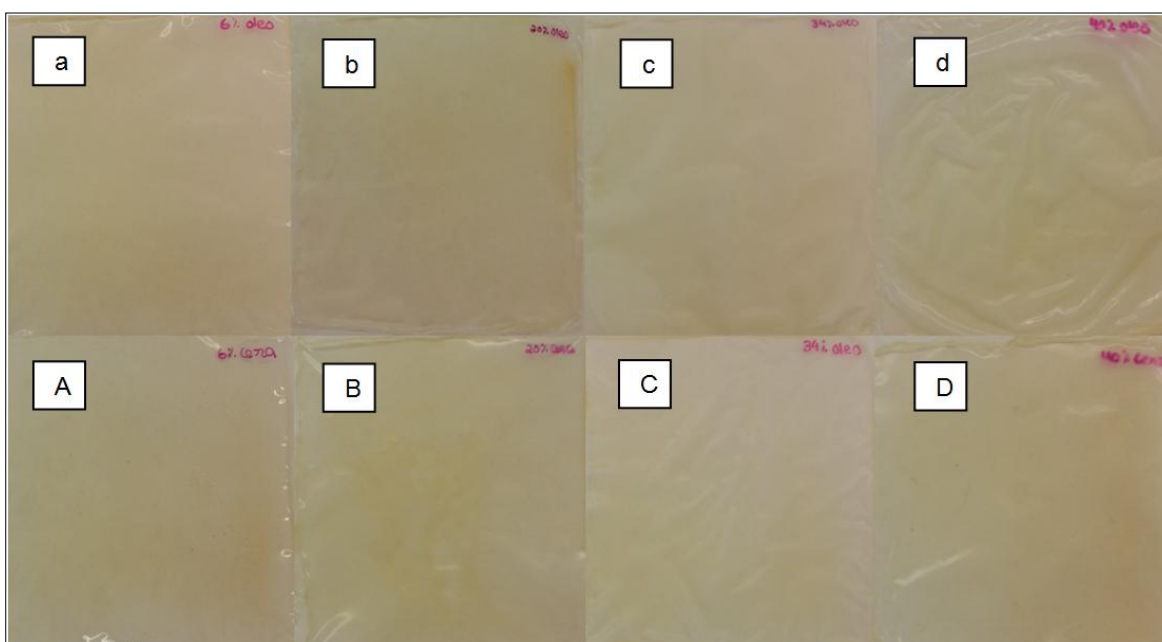


Figura 9: Amostras dos diferentes tipos de formulações, a) 6% ácido oleico; b) 20% ácido oleico; c) 34% ácido oleico; d) 40% ácido oleico; A) 6% cera de abelha; B) 20% cera de abelha; C) 34% cera de abelha; D) 40% cera de abelha

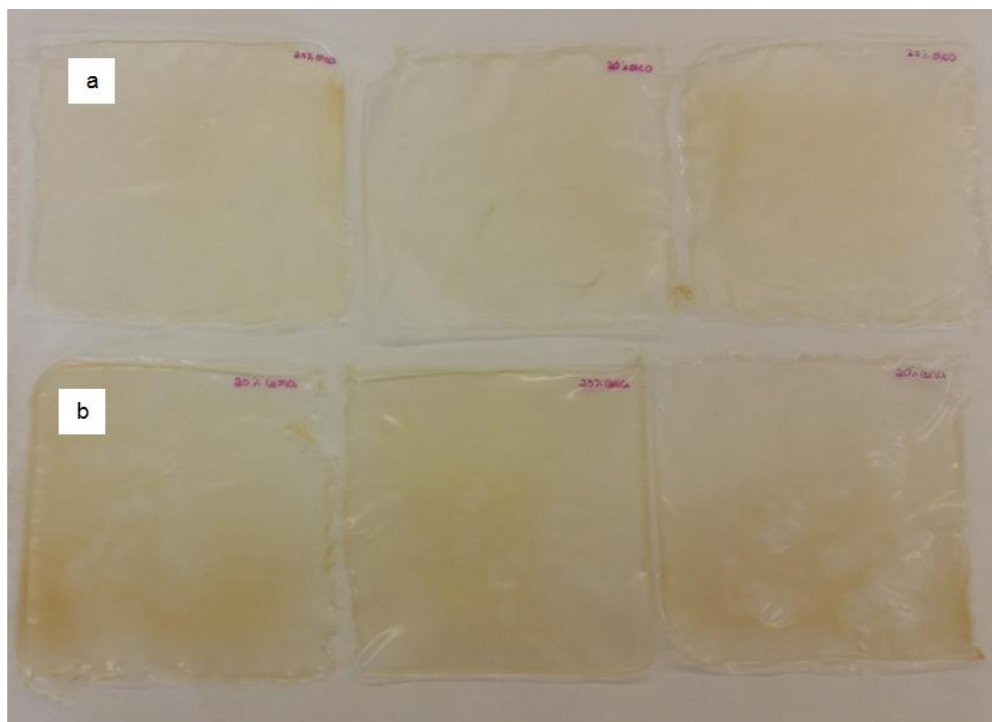


Figura 10: Películas de quitosano na linha a) com 20% de ácido oleico e na linha b) com 20% de cera de abelha

Para a formulação 8, cuja constituição inclui apenas a solução base de quitosano com plastificante e sem lípido, as películas sem reticulante eram mais transparentes e quase sem coloração, ficando mais opacas, enrugadas e quebradiças após a aplicação do TPP, o que as tornou numa das formulações mais difíceis de manusear (Figura 11).

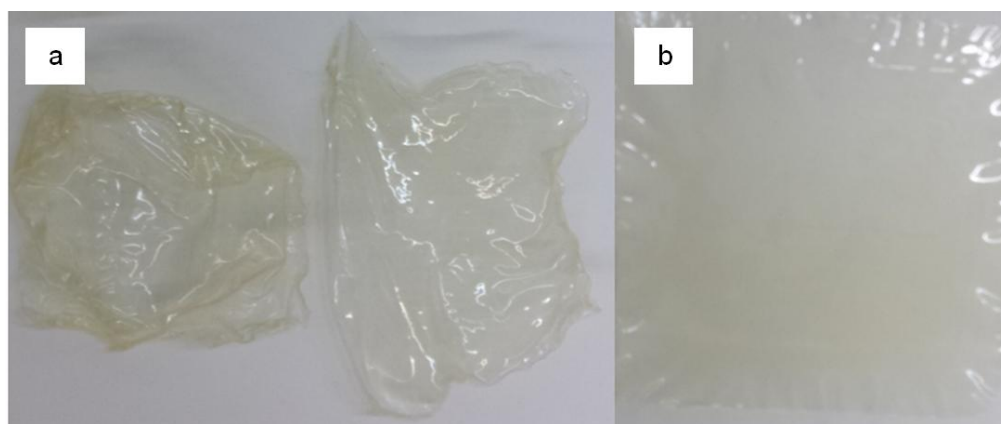


Figura 11: Películas de quitosano sem lípido, antes (b) e após (a) a aplicação de uma solução de 2,5% de TPP

A formulação 10, por não levar reticulante, manteve o seu aspeto original à saída da estufa. Contudo a falta de reticulante tornou-a demasiado sensível e aderente a superfícies colando facilmente aos materiais e a si própria. As formulações 8, 10 e 11, foram as mais complicadas de manusear; a formulação 8 por não ter lípido o que a tornou muito rígida (Figura 10), a 10 por não ter TPP tornando-se demasiado aderente

e sensível e a 11 por ter demasiado TPP. Todas as formulações com cera no geral formaram películas difíceis de manusear devido à baixa homogeneidade que apresentavam e ao aparecimento de bolhas após a secagem. Estas características tiveram bastante influência no corte das amostras para os ensaios.

4.1.1 Espessura

A espessura das películas foi medida nas amostras destinadas aos testes mecânicos e de permeabilidade. As películas com óleo apresentam valores de espessura entre 0,1 mm e 0,3 mm, enquanto que para as películas com cera os valores estão no intervalo 0,1 – 0,4 mm.

4.1.2 Mediação da cor

O modelo CIELAB permitiu estudar a diferença de cor provocada pela sobreposição de cada uma das formulações nas cartolinas coloridas.

4.1.2.1 Cor Branca

A Figura 12 apresenta a superfície de resposta da diferença total de cor para a cor branca em função da percentagem de ácido oleico e TPP.

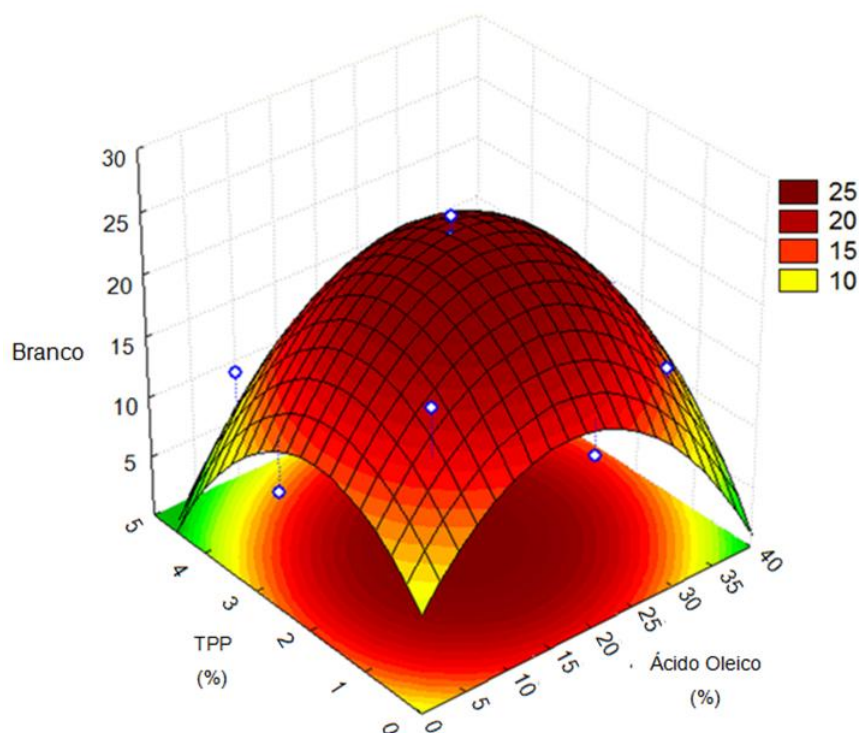


Figura 12: Superfície de resposta da diferença de cor para a cor branca obtida com as películas de óleo.

ΔE (Cor Branca) = $8,12 + 0,98 \text{ AO} - 0,03 \cdot \text{AO}^2 + 6,69 \text{ TPP} - 1,86 \cdot \text{TPP}^2 + 0,07 \text{ AO TPP}$; com um R^2 de 0,87 e um R^2 ajustado de 0,70 . * Variáveis que influenciam significativamente a variável dependente ($p < 0,05$)

As variáveis que influenciam significativamente o ΔE são o valor quadrático de ácido oleico e TPP. Verifica-se que os valores da diferença de cor são elevados para a maior parte do intervalo de valores de % AO e de TPP testados. O modelo prevê valores de $\Delta E < 10$ somente para as formulações contendo valores mínimos e máximos de AO e TPP.

Contrariamente ao que acontece nas películas das formulações de óleo, para as amostras das formulações de cera de abelha (Figura 13) observa-se uma gama muito maior de combinações de %TPP e CA que originam valores baixos de ΔE . Para valores intermédios de TPP (2 a 4%), a variação de cor mantém-se baixa e mais ou menos constante, dependendo pouco da quantidade de cera adicionada, uma vez que o elemento com capacidade de influenciar a alteração de cor é o valor quadrático de TPP. Porém, valores de $\Delta E < 10$ são observados só para a gama de %TPP referida em simultâneo com %CA entre 0 e 10%.

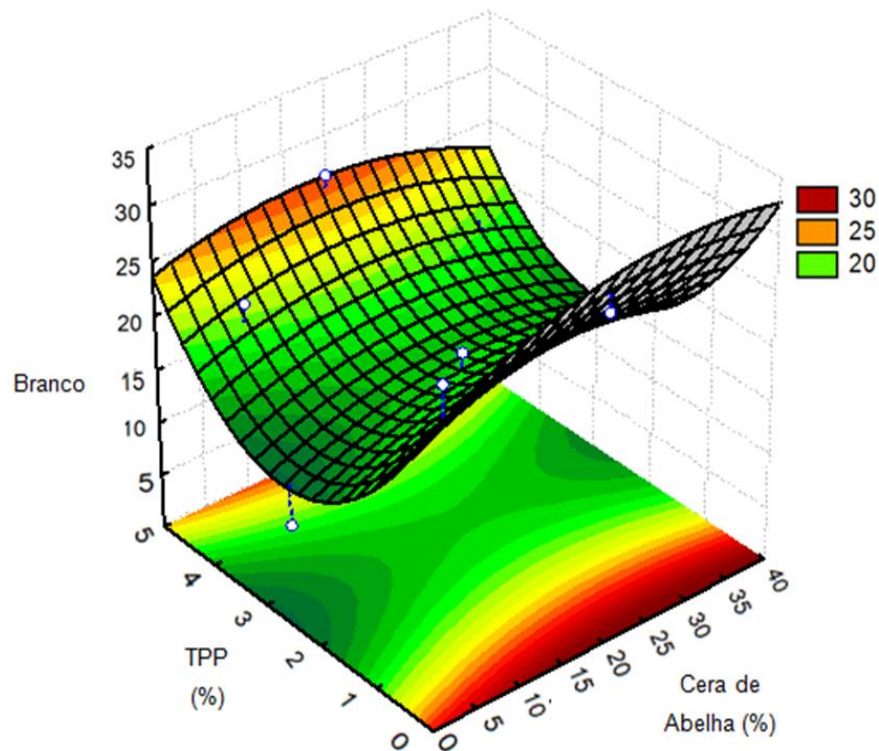


Figura 13: Superfície de resposta da diferença de cor para a cor branca obtida com as películas de cera.
 ΔE (Cor Branca) = $26,96 + 0,47 CA - 0,008 CA^2 - 10,73 TPP + 2,01 * TPP^2 - 0,036 CA TPP$; com um R^2 de 0,89 e um R^2 ajustado de 0,75. * Variável que influencia significativamente a variável dependente ($p < 0,05$)

A partir das duas figuras, verifica-se que as películas com cera tendem a provocar uma maior alteração de cor que as películas com ácido oleico, mas somente para valores extremos de %TPP (perto de 0% e de 5%). As películas com óleo só

apresentam valores baixos de ΔE para as formulações contendo valores mínimos e máximos de AO e TPP.

4.1.2.2 Cor Verde

A Figura 14 apresenta a superfície de resposta da diferença total de cor para a cor verde em função da percentagem de cera de abelha e TPP.

A variável que influencia significativamente o ΔE é o valor linear de CA. É possível observar que à medida que se aumenta a quantidade de cera, os valores da diferença de cor aumentam. O modelo prevê valores de $\Delta E < 10$ para as formulações contendo percentagens de cera inferiores a 10%, podendo ainda verificar-se uma diminuição no valor de ΔE para baixos teores de TPP.

Para valores elevados de cera (>35%) e baixos de TPP (< 1%) verificam-se maiores valores de diferença de cor verde.

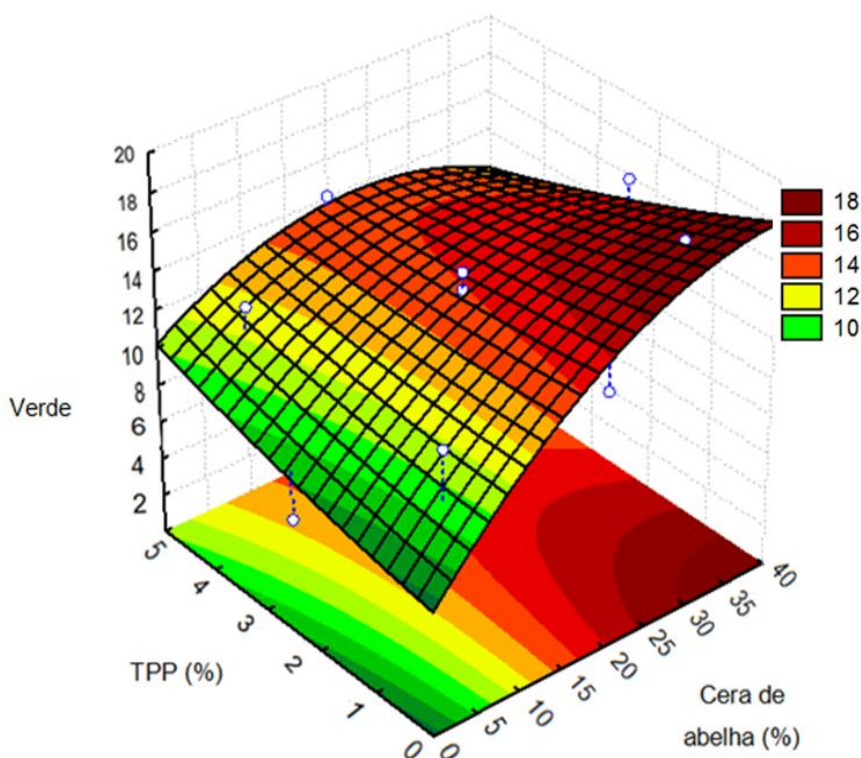


Figura 14: Superfície de resposta da diferença de cor para a cor verde obtida com as películas de cera.

ΔE (Cor Verde) = $6,55 + 0,55 \cdot CA - 0,007 CA^2 + 0,47 TPP + 0,05 TPP^2 - 0,05 CA TPP$; com um R^2 de 0,80 e um R^2 ajustado de 0,59. * Variável que influencia significativamente a variável dependente ($p < 0,05$)

Para as películas das formulações de ácido oleico não foi possível obter uma superfície de resposta com um bom ajustamento para a variação da cor verde; desta forma procedeu-se a uma comparação de médias utilizando uma ANOVA a 1 fator. A análise estatística das médias revelou que não existem diferenças significativas entre

as películas, ou seja, deve considerar-se que todas as amostras se comportam de forma idêntica, independentemente da formulação.

Na Figura 15 encontram-se representados graficamente os resultados obtidos para a diferença total de cor para a cor verde as películas das formulações de ácido oleico e cera de abelha, testadas.

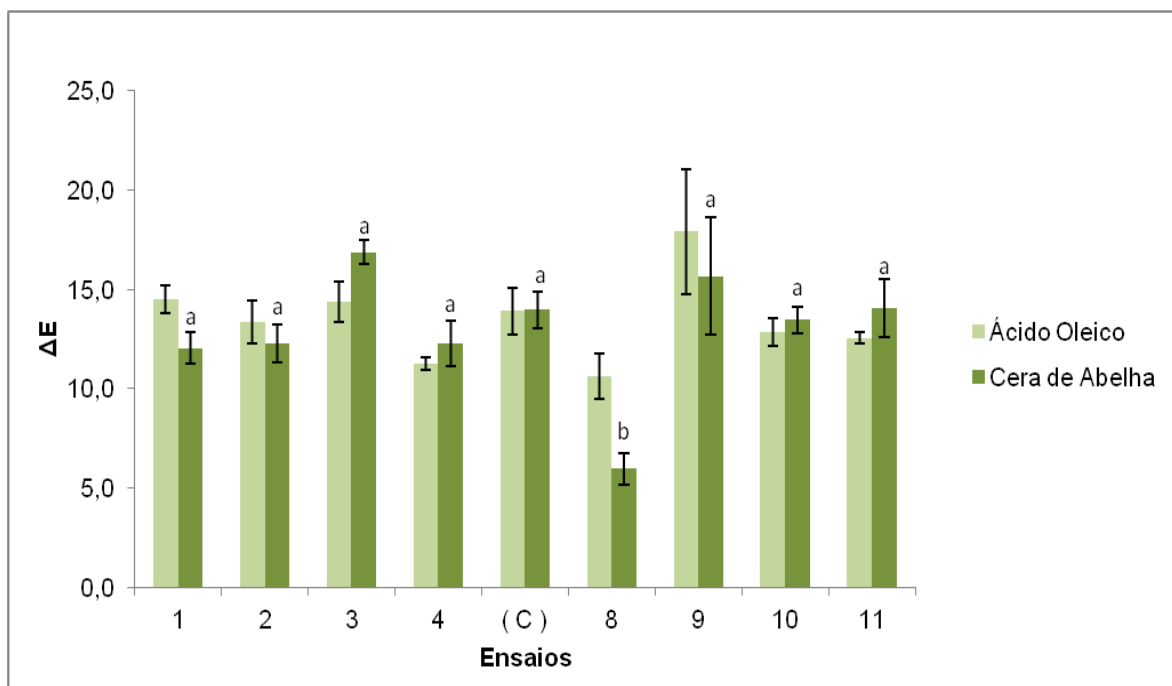


Figura 15: Valores de ΔE , relativos à cartolina de cor verde, para cada um dos ensaios de óleo e cera, onde C representa a média dos ensaios centrais. As barras pretas representam o desvio padrão. As letras a e b são dadas pela análise estatística das médias dos ensaios de cera, sendo que as letras minúsculas (a ou b) representam películas de óleo com médias significativamente diferentes.

Para as amostras correspondentes às formulações de óleo, de forma geral, mantendo a quantidade de TPP constante, obtêm-se maiores valores de ΔE para películas com maior quantidade de óleo.

Nas películas correspondentes aos ensaios 10 (20% AO; 0% TPP) e 11 (20% AO; 5% TPP) apesar das quantidades diferentes de TPP verifica-se que são ambos semelhantes e não são substancialmente diferentes dos restantes, à exceção do 8 por não conter óleo e do 9 por ter a quantidade máxima de óleo. É possível verificar que a alteração de cor verde provocada pelas películas de óleo e cera é muito semelhante.

4.1.2.3 Cor Amarela

Na Figura 16 encontram-se representados graficamente os resultados obtidos para a diferença total de cor para a cor amarela das películas das formulações de ácido oleico e cera de abelha, testadas. Novamente, não foi possível obter uma superfície de resposta com um bom ajustamento para a variação da cor, procedendo-se a uma comparação de médias utilizando uma ANOVA a 1 fator.

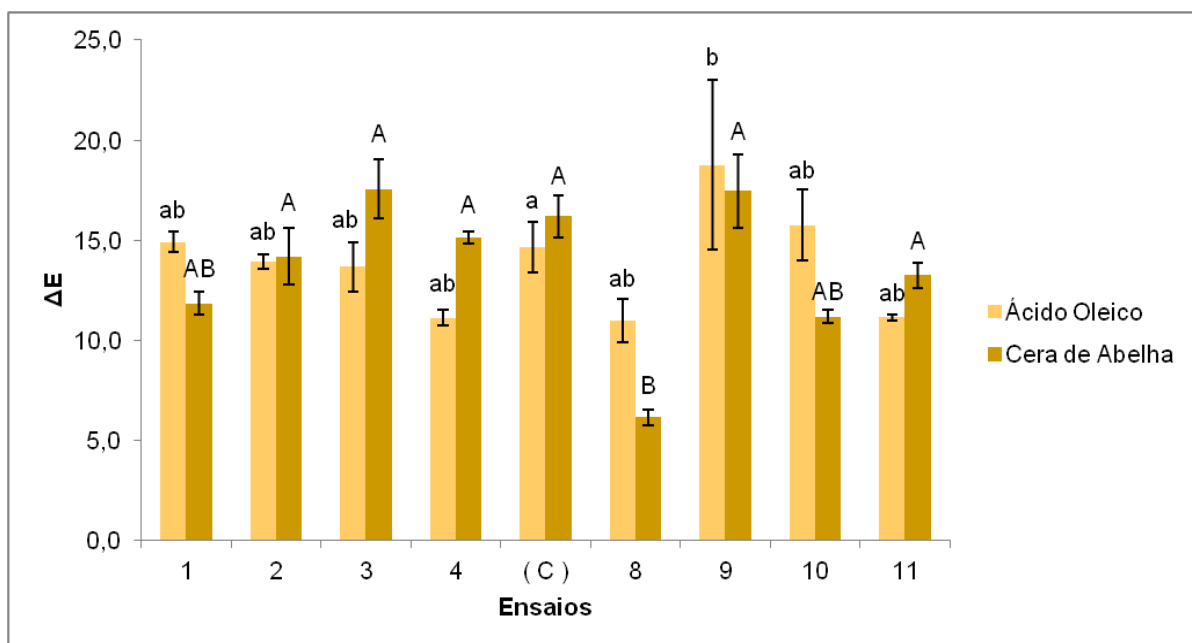


Figura 16: Valores de ΔE , relativos à cartolina de cor amarela, para cada um dos ensaios com óleo e cera, onde C representa a média dos ensaios centrais. As letras a, b, ab, A, B e AB são dadas pela análise estatística das médias dos ensaios de óleo e cera, sendo que as letras minúsculas (a ou b) representam películas de óleo com médias significativamente diferentes; e as letras maiúsculas (A ou B) representam, películas de cera com médias significativamente diferentes. As barras pretas representam o desvio padrão

É possível verificar que as películas com óleo não apresentam valores de ΔE significativamente diferentes entre si.

Relativamente às películas com cera de abelha, só a formulação sem cera apresenta um valor de ΔE substancialmente inferior às restantes, apesar da análise estatística não a considerar significativamente diferente das formulações 1 (6% CA; 0.73% TPP) e 10 (20% CA; 0% TPP).

4.1.2.4 Cor vermelha

A Figura 12 apresenta a superfície de resposta da diferença total de cor para a cor vermelha em função da percentagem de ácido oleico e TPP.

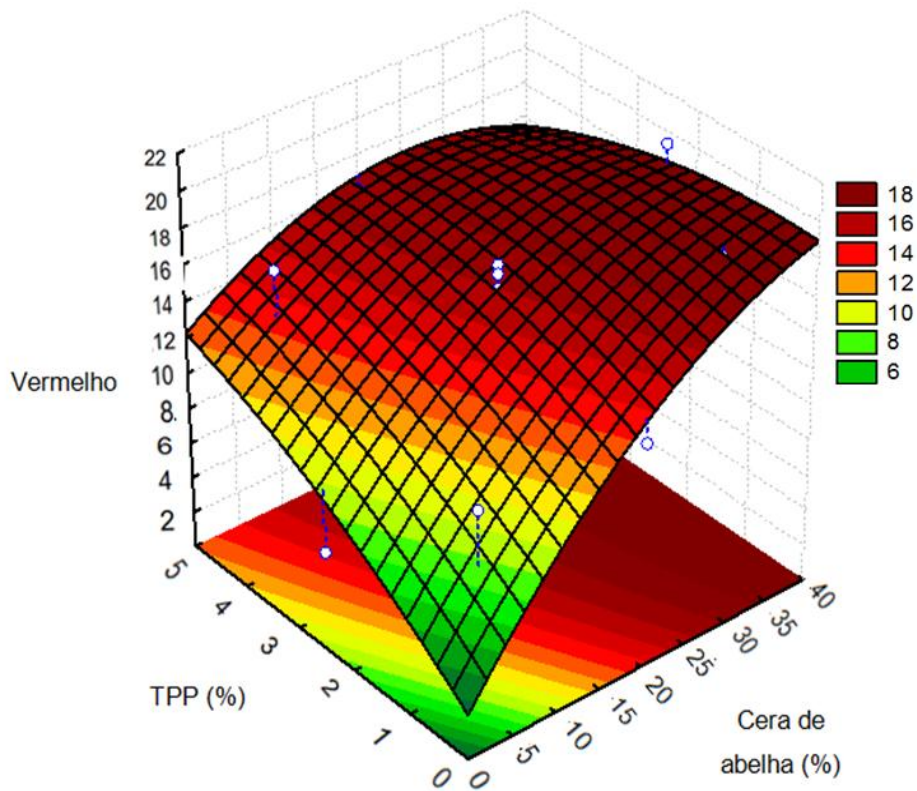


Figura 17: Superfície de resposta da diferença de cor para a cor vermelha obtida com as películas de cera.

ΔE (Cor Vermelha) = $2,48 + 0,70 \cdot CA - 0,007 CA^2 + 2,83 TPP - 0,18 TPP^2 - 0,07 CA TPP$; com um R^2 de 0,85 e um R^2 ajustado de 0,70. * Variável que influencia significativamente a variável dependente ($p < 0,05$)

A variável que influencia significativamente o ΔE para as películas de cera de abelha é o valor linear de percentagem de cera. É possível constatar que para valores de TPP acima dos 4%, por muito baixa que seja a quantidade de cera de abelha adicionada, verificam-se sempre valores de ΔE elevados. O modelo prevê valores de $\Delta E < 10$ para as formulações contendo percentagens de cera inferiores a 12% e quantidades baixas de TPP (0-3%).

Na Figura 17 é possível observar uma diferença total da cor vermelha máxima em formulações com quantidades muito elevadas de cera e TPP ($CA > 35\%$; $TPP > 4\%$) e uma diferença mínima em formulações com baixas quantidades de cera e TPP ($CA < 5\%$; $TPP < 1\%$).

Na Figura 18 encontram-se representados graficamente os resultados obtidos para a diferença total de cor para a cor vermelha das películas das formulações de ácido oleico (para as quais não foi possível obter uma superfície de resposta com um bom ajustamento) juntamente com as de cera de abelha e cera de abelha, testadas.

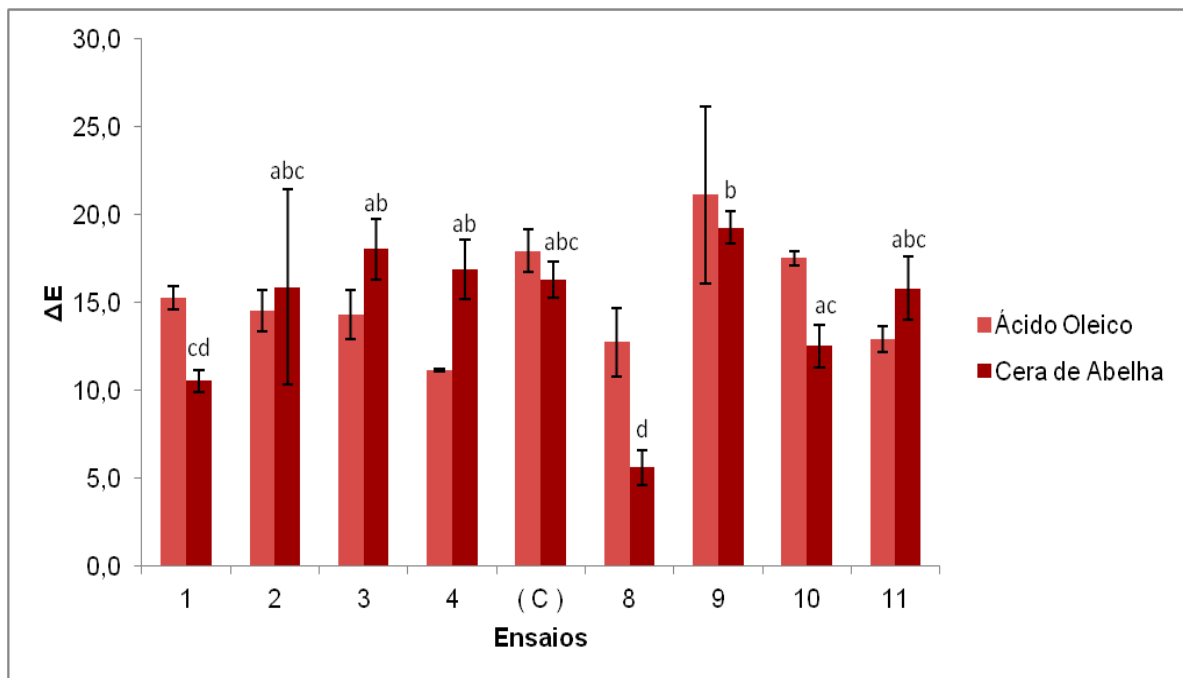


Figura 18: Valores de ΔE , relativos à cartolina de cor vermelha, para cada um dos ensaios de óleo e cera, onde C representa a média dos ensaios centrais. As barras pretas representam o desvio padrão. As letras a, b, c, ab, cd, abc, ac são dadas pela análise estatística das médias dos ensaios de cera, sendo que as letras minúsculas (a, b ou c) representam películas de cera com médias significativamente diferentes.

A análise considerou que todas as películas se comportam de forma idêntica independentemente da formulação, não havendo diferenças significativas nos valores de ΔE , como pode ser verificado na Figura 18, à exceção da diferença observada entre as películas das formulações 8 (0% AO; 2,5% TPP) e 9 (40% AO; 2,5% TPP).

4.1.3 Microscopia

A partir da técnica de microscopia eletrónica de varrimento foi possível observar a microestrutura das películas correspondentes às formulações 6, 8, 9 e 10 de ácido oleico e 5, 8, 9 e 10 de cera de abelha, utilizando para isso três ampliações diferentes: 170x, 400x e 1000x.

Na Figura 19 encontram-se representadas imagens de três películas cujas formulações contêm percentagens de cera de abelha diferentes para a mesma concentração de TPP (2,5%). É possível observar que as películas produzidas com a

formulação 8 são as que possuem uma superfície e uma secção reta com menos imperfeições e mais homogêneas pelo fato de não terem cera na sua constituição, enquanto que nas películas pertencentes a outras formulações se pode observar uma matriz muito mais irregular. É possível observar que mantendo a percentagem de TPP igual a 2,5%, um aumento da percentagem de cera de 20 para 40%, não altera substancialmente a morfologia das películas. Verifica-se ainda que as amostras do ensaio 8 apresentam bolhas que aumentam com a ampliação. Estas bolhas são formadas durante a análise, indicando que estas amostras são menos resistentes que as restantes ao feixe de eletrões.

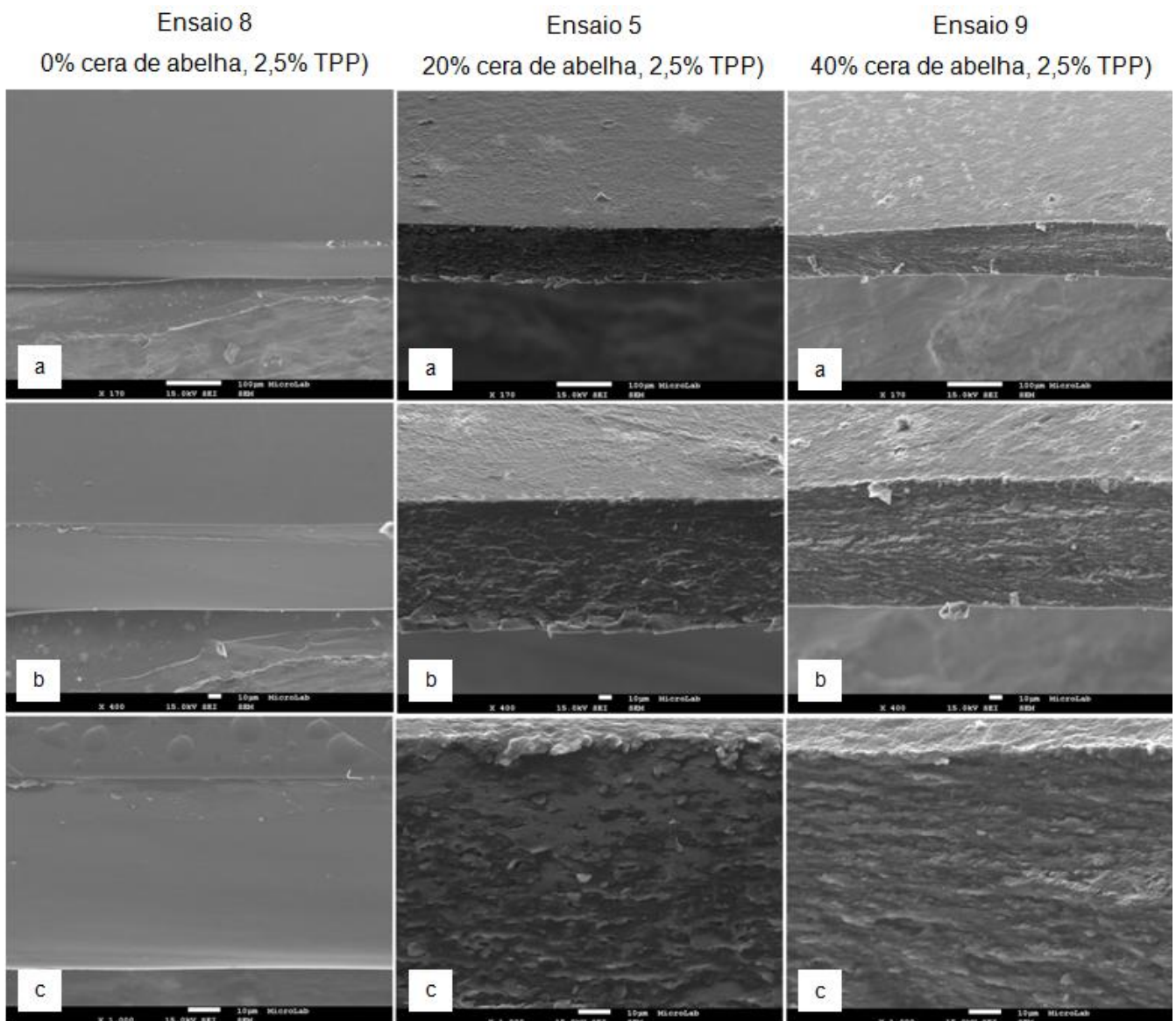


Figura 19: Microestrutura das películas de CA, obtida pela técnica SEM com diferentes ampliações: a) 170 b) 400 c) 1000

A Figura 20 representa imagens de três películas cujas formulações contêm percentagens diferentes de TPP, mantendo a quantidade de cera de abelha constante (20%). A película da formulação 10 (sem TPP) aparenta ter uma superfície mais lisa.

Porém, aumentando a %TPP de 2,5 para 5%, não parece alterar substancialmente as características físicas da superfície e da secção das películas. Comparando com as imagens das películas sem cera (Figura 19, 0% cera de abelha, 2,5% TPP), verifica-se que a inclusão da cera na matriz polimérica é o fator que mais altera a microestrutura.

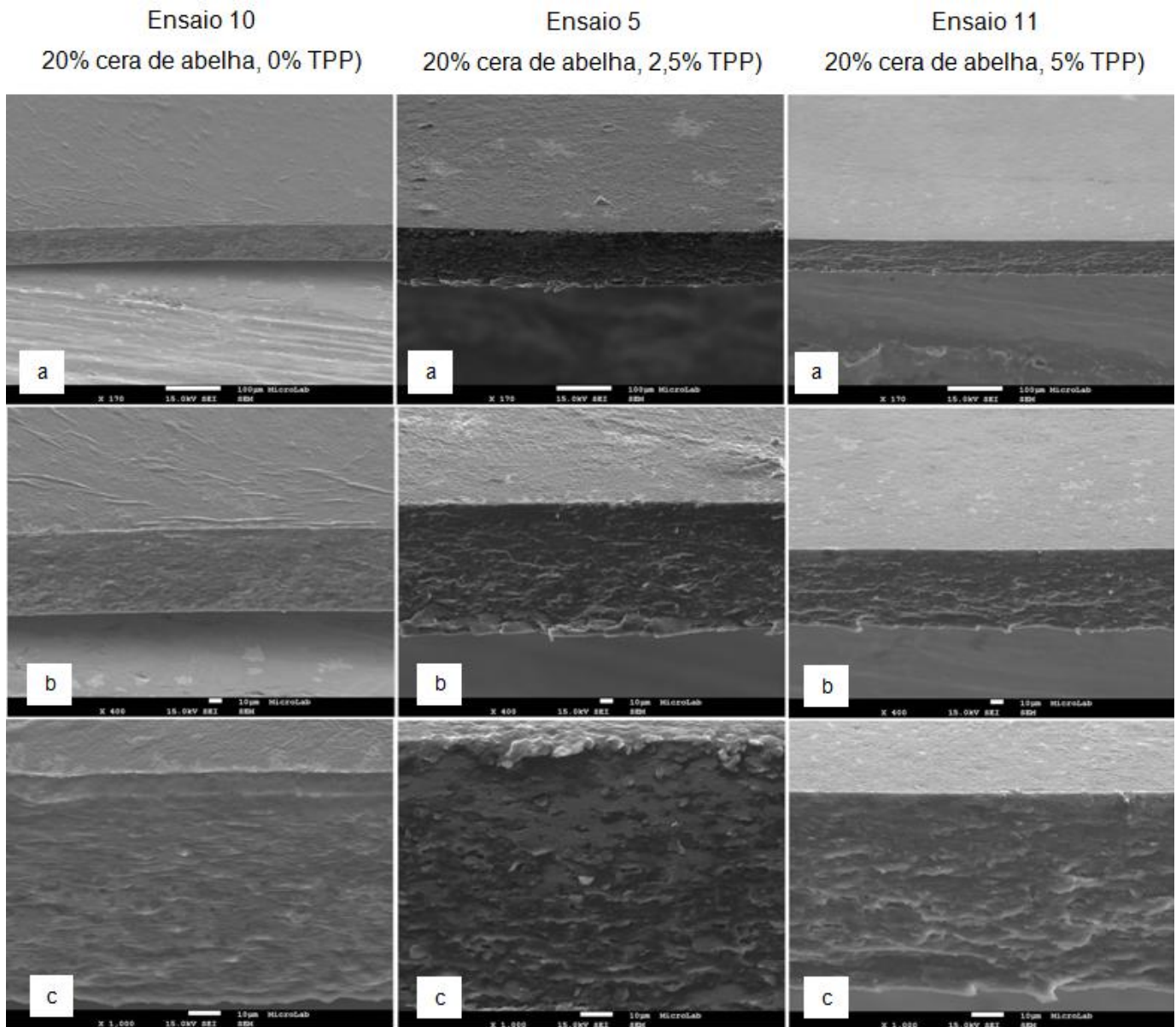


Figura 20: Microestrutura das películas de CA, obtida pela técnica SEM com diferentes ampliações: a) 170 b) 400 c) 1000

A Figura 21 representa a microestrutura de três películas cujas formulações contêm a mesma quantidade de TPP (2,5%) mas com percentagens diferentes de ácido oleico. À semelhança do que aconteceu com as películas de cera, a película correspondente à formulação 8 é das três a que tem uma superfície mais lisa e uma estrutura mais homogénea. Nas películas das formulações 6 e 9 verifica-se uma matriz

densa mas heterogênea. A sua superfície apresenta uma topografia rugosa, que parece aumentar com o aumento da percentagem de óleo usada. Esta rugosidade poderá ter origem no facto de as gotas de óleo superficiais se encontrarem no estado líquido e permitirem o enrugamento da superfície durante a aplicação do TPP. O mesmo não acontece com os filmes com cera, na medida em que a cera no estado sólido apresenta uma resistência mecânica superior, inibindo a formação de uma superfície rugosa aquando da aplicação do TPP.

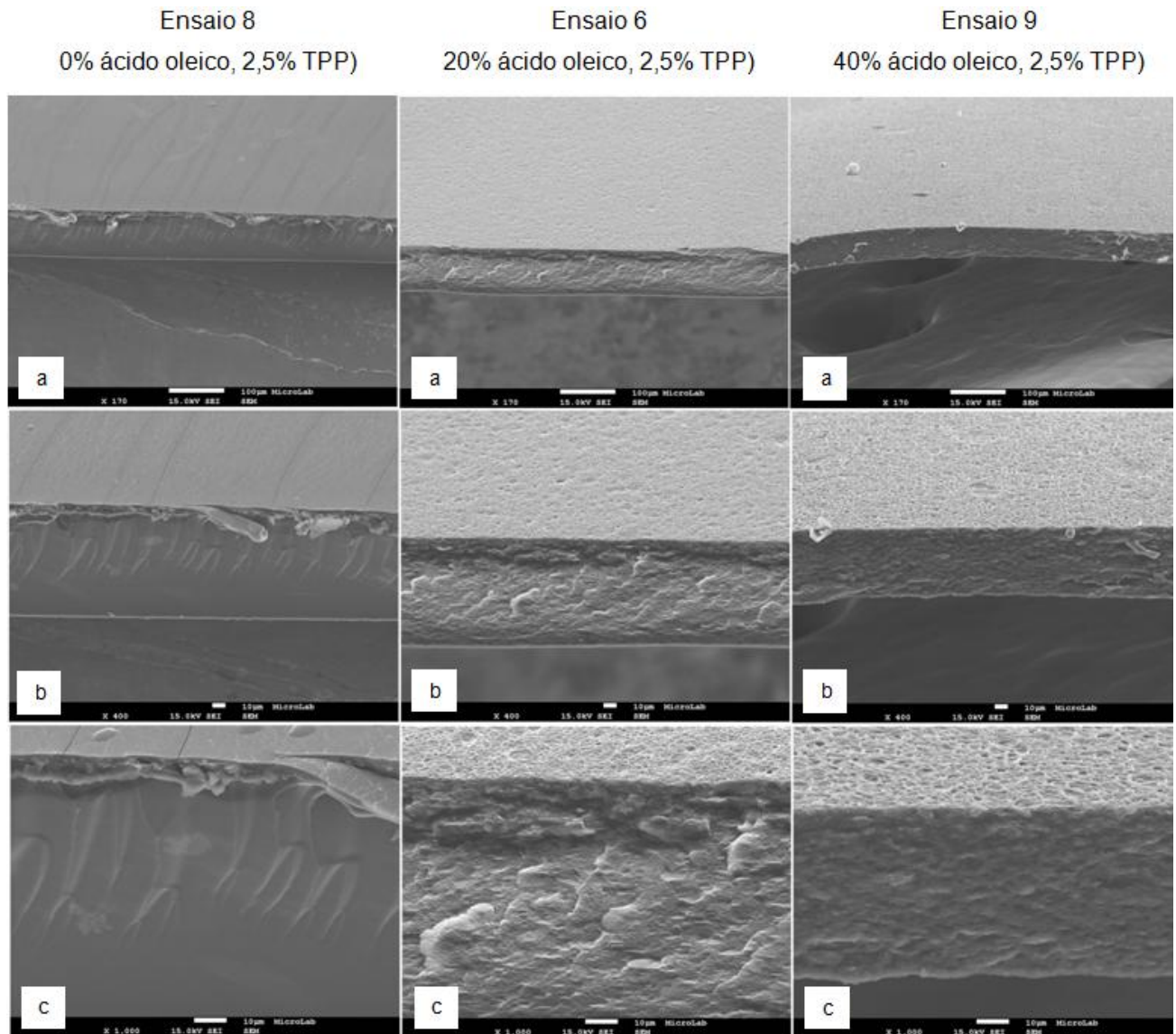


Figura 21: Microestrutura das películas de AO, obtida pela técnica SEM com diferentes ampliações: a) 170 b) 400 c) 1000

A Figura 22 representa imagens da microestrutura de três películas cujas formulações contêm percentagens diferentes de TPP, mantendo a quantidade de ácido oleico constante (20%).

É possível observar que a película do ensaio 10 (sem TPP) tem uma superfície e secção reta muito mais lisas e homogêneas que as restantes.

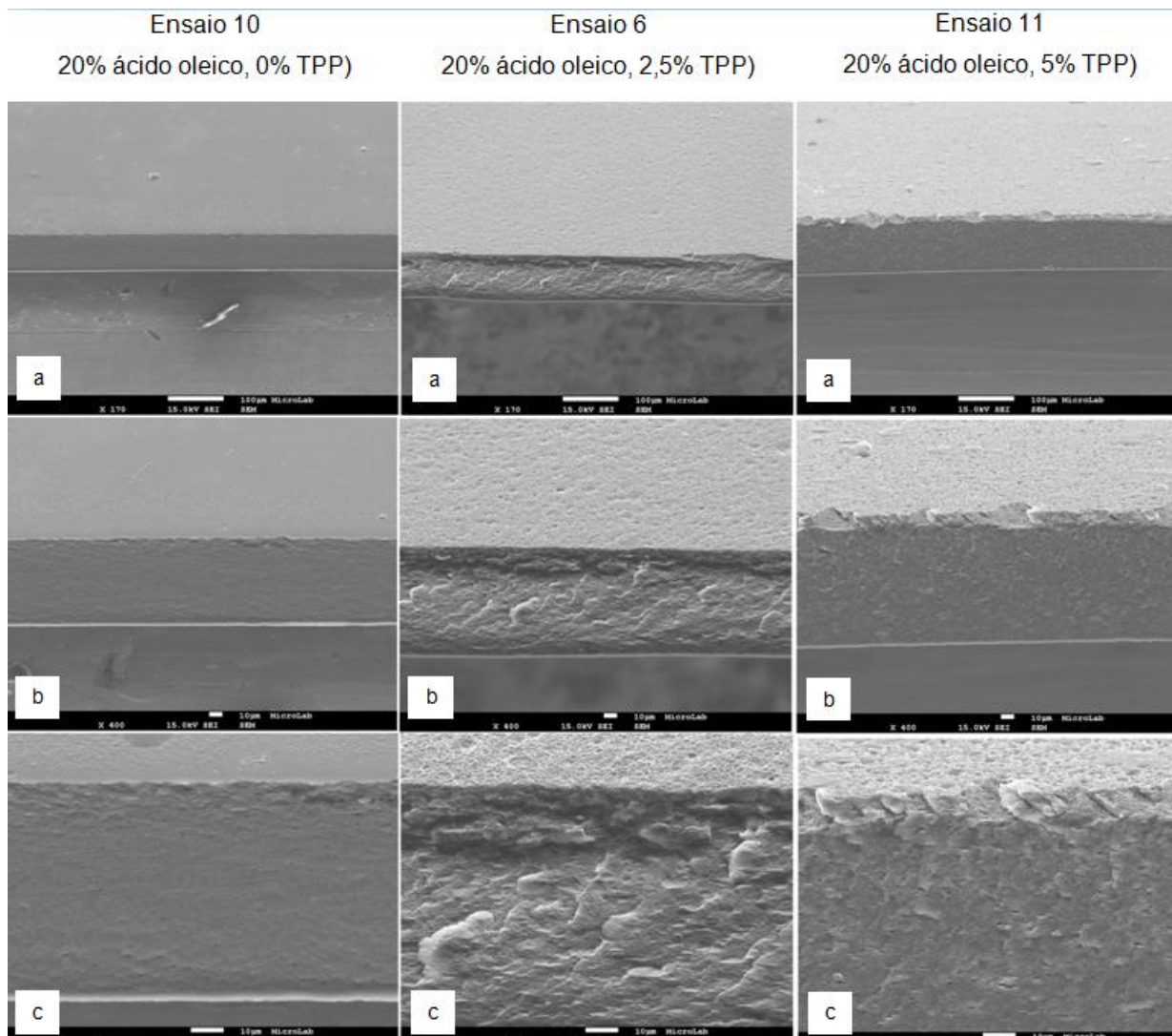


Figura 22: Microestrutura das películas de AO, obtida pela técnica SEM com diferentes ampliações: a) 170 b) 400 c) 1000

Ao contrário do que foi observado para as películas com cera, para as películas com óleo a sua microestrutura é pouco alterada com a incorporação de 20% de ácido oleico e 5% TPP em relação a 20% ácido oleico e 2,5% TPP. Porém, há uma alteração muito substancial da microestrutura, tornando-se muito menos lisa, com o aumento da quantidade de TPP aplicada. Neste caso, a quantidade de TPP parece ter uma influência maior na microestrutura das películas que a fase lipídica.

As películas analisadas com as formulações de ácido oleico aparentam ser um pouco mais homogêneas que as películas das formulações de cera, não devido ao TPP mas ao óleo em si. O ácido oleico por se encontrar líquido à temperatura ambiente torna-se mais fácil de incorporar na matriz ao contrário da cera de abelha.

4.2 Propriedades higroscópicas

4.2.1 Solubilidade e capacidade de absorção de água

A capacidade de absorção de água e a solubilidade são características importantes principalmente em produtos metabolicamente ativos, como os hortofrutícolas, de forma a manter a integridade do alimento.

A Figura 23 apresenta a superfície de resposta da solubilidade das películas em função da percentagem de ácido oleico e TPP.

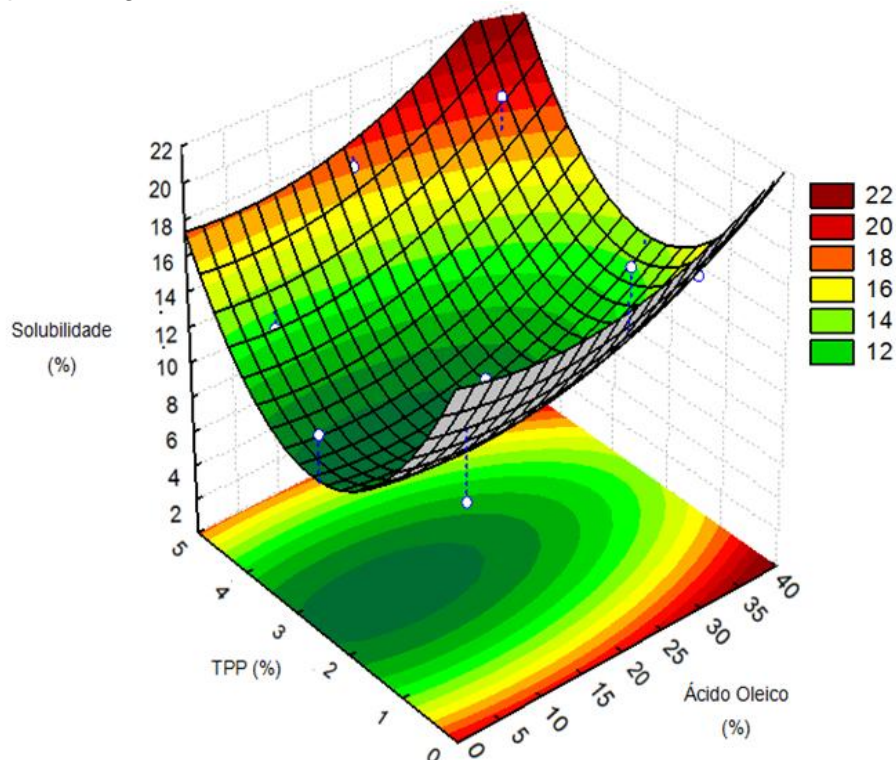


Figura 23: Superfície de resposta obtida para a solubilidade das películas de óleo.

$$\text{Solubilidade} = 19,44 - 0,13 \text{ AO} + 0,006 \text{ AO}^2 - 8,08 \text{ TPP} + 1,553 * \text{TPP}^2 + 0,01 \text{ AO TPP};$$
 com um R^2 de 0,80 e um R^2 ajustado de 0,59. * Variável que influencia significativamente a variável dependente ($p < 0,05$)

A variável que mais influencia significativamente o valor da solubilidade é o valor quadrático de TPP. Verifica-se que as películas de ácido oleico que apresentam valores mais elevados de solubilidade são as que correspondem a formulações com uma quantidade muito alta ou baixa de TPP ($>4,5\%$ ou $<1\%$). O modelo prevê valores mais baixos de solubilidade ($<12\%$) para as películas com formulações com quantidades médias de TPP ($1,5\%-3,5\%$), e quantidades baixas de ácido oleico ($<15\%$).

O comportamento observado nas películas de ácido oleico sugere dois processos diferentes. Nas películas com uma quantidade baixa de TPP não ocorre uma

reticulação eficiente da matriz polimérica, permitindo a solubilização do quitosano e/ou uma difusão mais facilitada dos outros componentes de baixa massa molecular presentes (glicerol e *tween 80*). Por outro lado, nas películas com demasiado TPP, o excesso que não reagiu pode ter-se transferido para o meio líquido aquando da imersão em água, diminuindo a massa total da película seca. Apesar de não ter sido contemplado neste trabalho, seria possível verificar a veracidade destas hipóteses analisando a água onde foram imersas as amostras durante o ensaio.

Não foi possível obter uma superfície de resposta (com um bom ajustamento) para as películas com cera de abelha. Desta forma realizou-se uma análise comparativa das médias por metodologias ANOVA a 1 fator, em que estatisticamente não foram encontradas diferenças significativas para a solubilidade das diferentes películas das formulações de cera, o que pode sugerir uma grande heterogeneidade das amostras utilizadas ou falhas no método experimental devido a possíveis desintegrações durante o período de imersão.

Na Figura 24 encontram-se representados graficamente os resultados obtidos para a solubilidade das películas das formulações de cera de abelha, em conjunto com as de ácido oleico já discutidas acima.

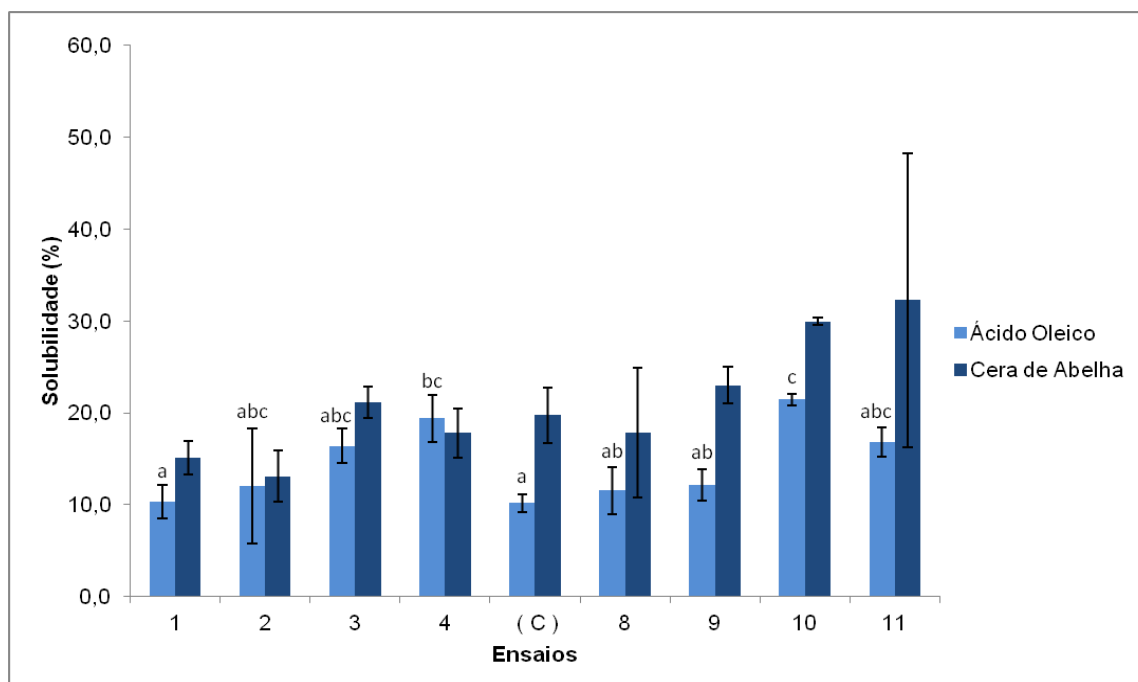


Figura 24: Solubilidade em água das películas com cera de abelha e ácido oleico, onde o C representa a média dos ensaios centrais. As barras pretas representam o desvio padrão. As letras a, c, bc, ab, abc são dadas pela análise estatística das médias dos ensaios de óleo, sendo que as letras minúsculas (a ou c) representam películas de óleo com médias significativamente diferentes. As barras pretas representam o desvio padrão.

Pela análise dos dados obtidos (Figura 24) observa-se que os valores mais elevados de solubilidade nas películas com cera, são obtidos para as formulações com teores máximos de cera ou TPP (9 e 11, respetivamente), ou para as que não contêm cera ou TPP (8 e 10 respetivamente). Seria de esperar que as formulações sem cera ou TPP dessem origem a películas mais solúveis em água.

Uma vez que a cera de abelha tem um efeito hidrofóbico e o TPP tem um efeito reticulante, tornando a matriz mais hidrofóbica e resistente, os resultados obtidos para as películas dos ensaios 9 (40% CA; 2,5% TPP) e 11 (20% CA; 5% TPP) não eram esperados. Existe a possibilidade de na interface entre as partículas de cera e a matriz polimérica existirem zonas com pouca densidade por onde a água entra, facilitando a transferência de componentes da película para o exterior. Este fenómeno estaria de acordo com os resultados observados durante a análise da microscopia, onde se verificou que a inclusão de cera tem uma grande influencia na alteração da matriz, isto acontece por ser um material muito difícil de emulsionar o que leva a uma matriz mais descontínua. Por outro lado, para concentrações elevadas de TPP, poderá haver um excesso que não reage e que se transfere para o exterior da película em contato com a água. O fato da cera se encontrar no estado sólido pode dificultar a reticulação da matriz pelo TPP e criar zonas com maior acumulação de TPP por reagir.

A Figura 25 apresenta a superfície de resposta da capacidade de absorção de água em função da percentagem de cera de abelha e TPP.

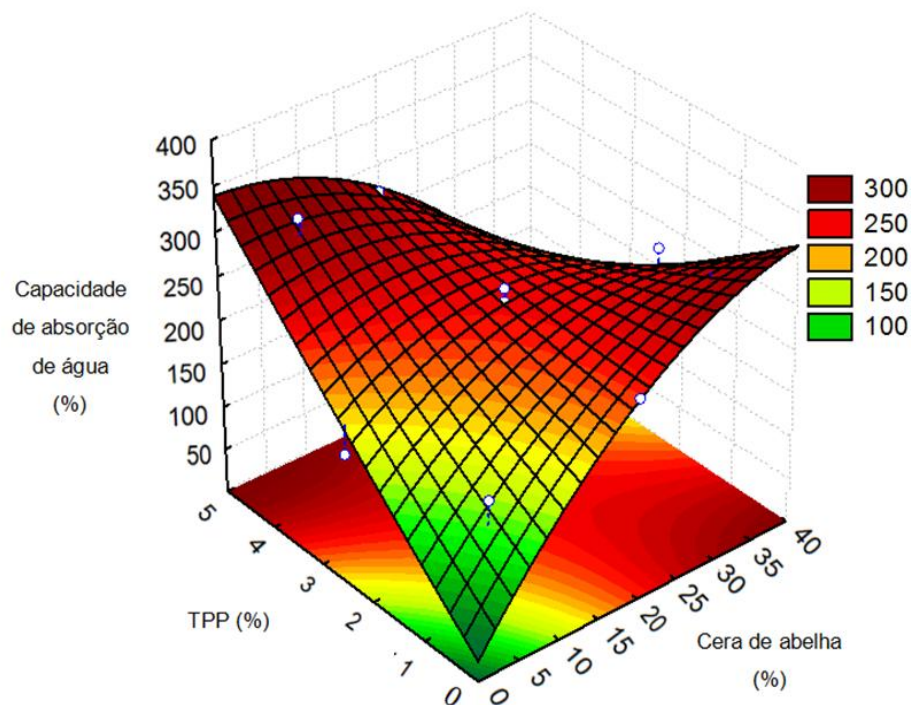


Figura 25: Superfície de resposta obtida para a capacidade de absorver água das películas de cera.

Capacidade de absorção de água = $23,09 + 13,25 CA - 0,15 CA^2 + 58,65 TPP + 0,90 TPP^2 - 2,71 * CA TPP$; com um R^2 de 0,91 e um R^2 ajustado de 0,81. * Variável que influencia significativamente a variável dependente ($p < 0,05$)

A variável que mais influencia significativamente o valor da capacidade de absorver água é o valor do efeito sinérgico da cera de abelha e do TPP. Verifica-se que os valores da capacidade de absorção de água são elevados para a maior parte do intervalo de valores de percentagens de cera e TPP testados. O modelo prevê que existe uma pequena gama de formulações para as quais a capacidade de absorção de água das películas é baixa (<100). As combinações mais favoráveis são as que apresentam baixos valores de cera (<5%) e TPP (<1%).

Como foi verificado pelos resultados da microscopia, a estrutura das películas de cera apresenta-se mais heterogénea e menos densa, devido à grande dificuldade que existe em emulsionar a cera e retirar as bolhas de ar incorporadas na agitação. Este fenómeno pode levar à formação de partículas sólidas de cera ao longo da matriz polimérica, cuja interface constitui pontos de entrada de água.

Não foi possível obter superfície de resposta com um bom ajustamento para a capacidade de absorção de água das películas das formulações de ácido oleico. Foi realizada a comparação estatística das médias dos resultados obtidos para a capacidade de absorção de água das películas de ácido oleico com recurso a uma ANOVA a 1 fator. Na Figura 26 encontram-se representados graficamente os resultados obtidos para essas películas com a análise estatística, juntamente com as

médias obtidas para as películas de cera (que segundo a análise estatística das médias comportam-se da mesma forma independentemente da formulação).

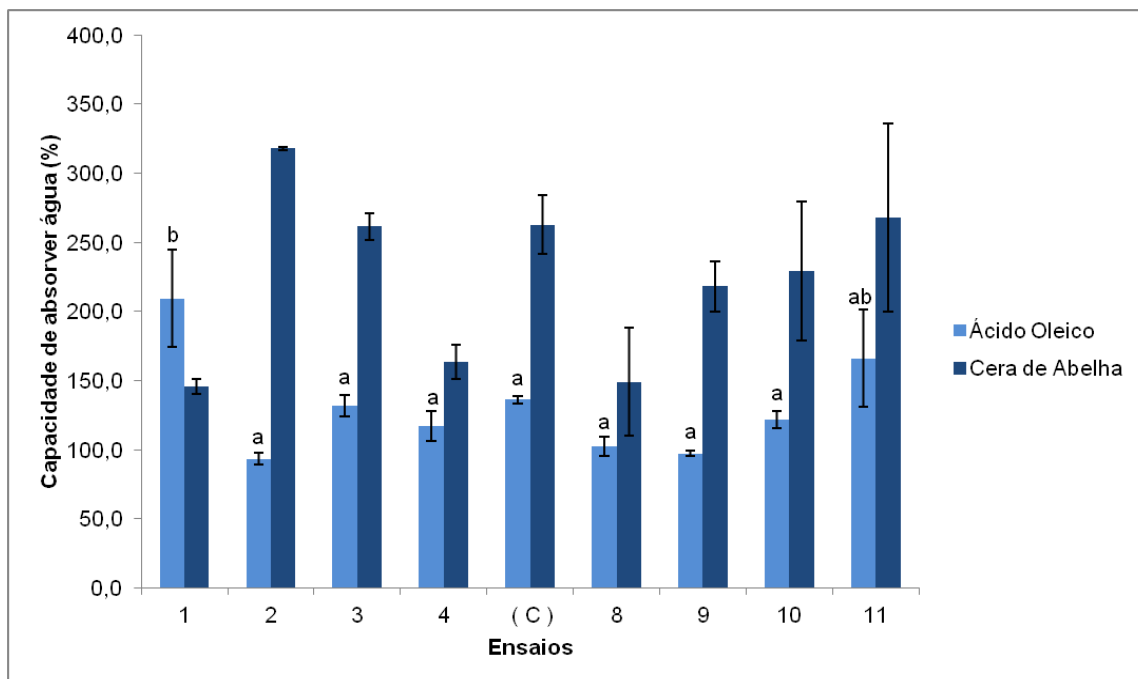


Figura 26: Capacidade de absorção de água, das películas de cera de abelha e ácido oleico, onde C representa a média dos ensaios centrais. As letras a, b e ab são dadas pela análise estatística das médias dos ensaios de ácido oleico, sendo que letras iguais representam médias que não diferem significativamente. As barras pretas representam o desvio padrão.

Foi observado que quase todas as películas estudadas das formulações de óleo e cera apresentaram uma capacidade de absorver água acima dos 100%, sendo que as películas das formulações de cera apresentaram valores de capacidade de absorção da água muito superior aos observados para as películas com ácido oleico.

É possível verificar (Figura 26) que as películas correspondentes às formulações de óleo que mostraram uma maior resistência à absorção de água foram a 2 (6% AO; 4,3% TPP) e a 9 (40% AO, 2,5% TPP). Contudo, a comparação estatística das médias não detetou quaisquer diferenças significativas entre estas duas formulações e a 3 (34% AO; 0,73% TPP), 4 (34% AO; 4,3% TPP), centrais, 8 (0% AO, 2,5% TPP) e 10 (20% AO, 0% TPP), apesar de cada uma das películas destas formulações apresentar uma constituição bastante diferente. A película da formulação 1 (6% AO, 0,73% TPP) foi considerada pelo programa como claramente superior às restantes, talvez por ser a única formulação que apresenta, ao mesmo tempo, valores muito baixos de óleo e TPP, contudo não foi considerada significativamente diferente da formulação 11 (20% AO; 5% TPP).

4.2.2 Isotermas de adsorção de água

O estudo da isotermas de adsorção de água permite avaliar como é que as películas se comportam em atmosferas com diferentes humidades relativas. As isotermas de adsorção expressam a relação de equilíbrio entre a quantidade de água presente na atmosfera e a presente na película.

Nas isotermas de adsorção das películas de ácido oleico (Figura 27) é possível observar que a adsorção de vapor de água é muito idêntica para todas as películas para valores de $a_w < 0,75$. Acima desse valor, as películas que adsorveram mais água da atmosfera correspondem às formulações 8 (0% AO; 2,5% TPP) e 10 (20% AO; 0% TPP): as de 8 por não terem óleo e as de 10 por não terem TPP. A película da formulação central (20% AO; 2,5% TPP) apresenta valores médios.

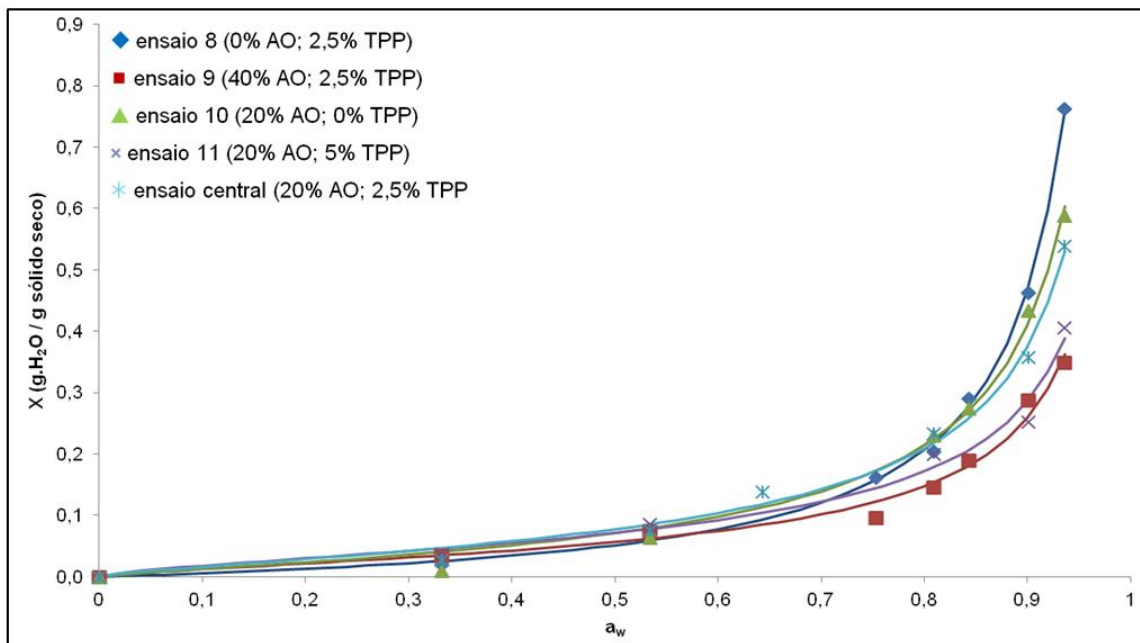


Figura 27: Isotermas de adsorção para as películas com ácido oleico. As linhas correspondem ao ajuste do modelo de Oswin.

As películas que menos água adsorveram foram as das formulações 11 (20% AO; 5% TPP) e 9 (40% AO; 2,5% TPP). A de 11 por terem a quantidade máxima de TPP e a de 9 por terem a quantidade máxima de óleo. É facilmente observada uma relação inversa entre a quantidade de ácido oleico adicionado, para a mesma %TPP, e a quantidade de água adsorvida (ensaios 8 e 9), o mesmo se pode observar com o aumento de %TPP para o mesmo teor de ácido oleico (ensaios 10, central e 11). Porém, o teor de ácido oleico é o fator com mais influência. Este fenómeno deve-se sobretudo ao seu comportamento hidrofóbico.

No estudo realizado por Vargas *et al.* (2009), onde se prepararam películas de quitosano (1% m/m) compósitas de ácido oleico com uma concentração final de 0%, 1%, 2% e 4% com a adição de *tween 80* a (0,1% v/m), foi igualmente observada uma diminuição da quantidade de água adsorvida à medida que a quantidade de ácido oleico aumentava. Foram apontadas duas razões possíveis: uma diminuição de espaço disponível na matriz filmogénica do quitosano devido ao aumento da quantidade de cadeias hidrofóbicas de ácidos gordos presentes na matriz, ou uma diminuição da capacidade hidrofílica das moléculas de quitosano devido a uma neutralização electrostática dos grupos amina devido aos grupos carboxílicos presentes no ácido oleico.

As isotermas de adsorção das películas correspondentes às formulações compósitas de cera de abelha (Figura 28) demonstram que a adsorção de vapor de água é muito semelhante para todas as formulações para valores de $a_w < 0,53$. A partir deste valor, a película da formulação 8 (0% AO; 2,5% TPP) destacou-se com uma maior adsorção. As películas das formulações 10 (20% CA; 0% TPP) e 11 (20% CA; 5% TPP) encontram-se sobrepostas, apesar da diferença significativa de TPP entre elas, indicando que o efeito da quantidade de cera sobre o processo de adsorção se sobrepõe ao efeito do TPP. As películas que menos água adsorveram foram as da formulação central (20% CA; 2,5% TPP) e 9 (40% CA; 2,5% TPP).

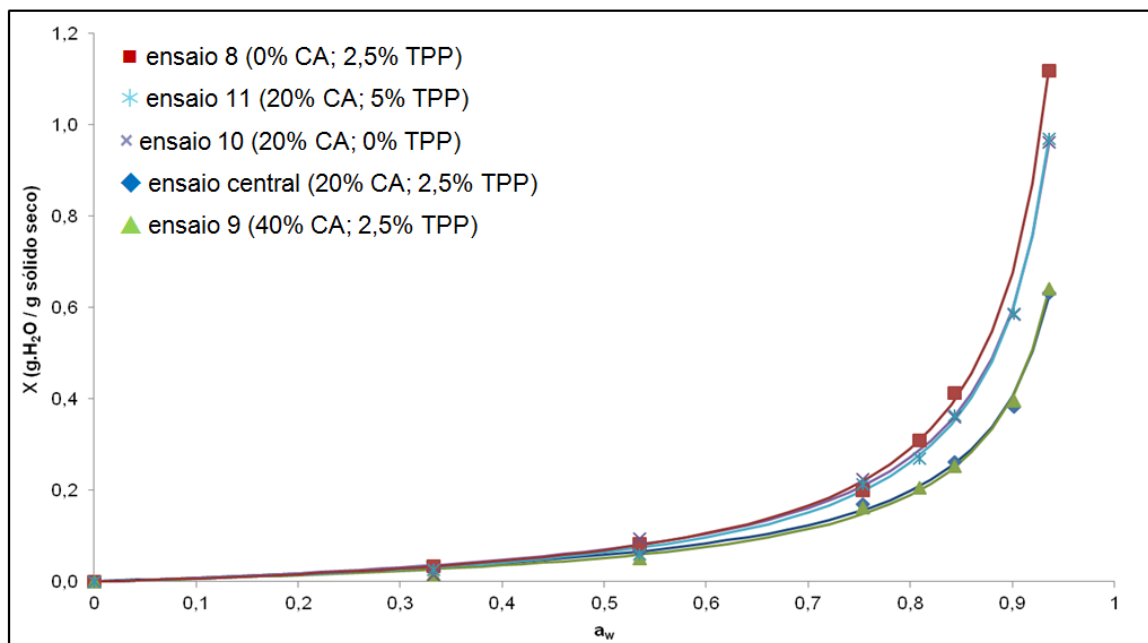


Figura 28: Isotermas de adsorção para as películas com cera de abelha. As linhas correspondem ao ajuste do modelo de Oswin.

No geral, as películas das formulações com cera de abelha apresentam uma maior adsorção de água que as de ácido oleico, para o mesmo valor de a_w . Este fato pode

estar relacionado com a maior dificuldade em emulsionar a cera do que óleo na matriz polimérica, originando uma microestrutura mais descontínua que permite a acumulação de moléculas de água na interface entre as partículas sólidas de cera e as moléculas de quitosano.

As isotermas de adsorção de todas as películas foram ajustadas pelo modelo de Oswin, cujos parâmetros são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Parâmetros do modelo de Oswin utilizados para ajustar as isotermas de adsorção.

		Ensaio	% Lípido	% TPP	C	K	R ²
Películas de ácido oleico		8	0	2,5	0,051	1,004	0,999
		9	40	2,5	0,056	0,693	0,993
		10	20	0	0,071	0,800	0,997
		11	20	5	0,072	0,631	0,992
		12	20	2,5	0,078	0,717	0,996
Películas de cera de abelha		6	20	2,5	0,059	0,880	0,998
		8	0	2,5	0,069	1,037	0,999
		9	40	2,5	0,052	0,932	0,999
		10	20	0	0,071	0,970	0,999
		11	20	5	0,065	1,010	0,999

4.2.3 Permeabilidade ao vapor de água

A Figura 29 apresenta a superfície de resposta da permeabilidade à água em função da percentagem de ácido oleico e TPP

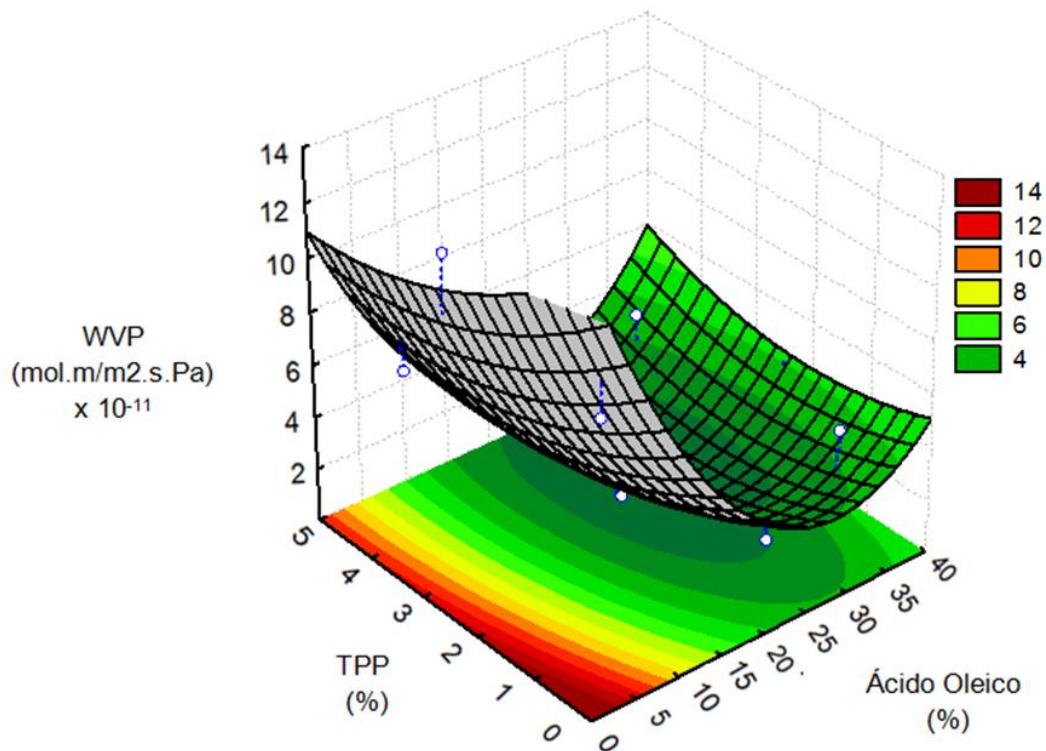


Figura 29: Superfície de resposta obtida para a permeabilidade ao vapor de água das películas de óleo.

$WVP \times 10^{-11} = 15,82 - 0,89 \cdot AO + 0,016 \cdot AO^2 - 1,97 \cdot TPP + 0,200 \cdot TPP^2 + 0,028 \cdot AO \cdot TPP$; com um R^2 de 0,91 e um R^2 ajustado de 0,83. * Variáveis que influenciam significativamente a variável dependente ($p < 0,05$)

As variáveis que mais influenciam significativamente o valor da permeabilidade são o valor linear e quadrático do ácido oleico. As formulações que apresentam valores mínimos de permeabilidade (4 mol.m/m².s.Pa) são as que contêm altas quantidades de óleo (25%-30%) e valores TPP superiores a 1%. O óleo, por ser hidrofóbico, vai conferir esta propriedade às películas formadas, enquanto que o TPP vai reticular a matriz polimérica, tornando-a mais resistente.

O modelo prevê valores de permeabilidade mais elevados para formulações com uma quantidade baixa de óleo (<5%). Estes resultados vão de encontro aos apresentados nas isotermas de adsorção (>%AO implicou <adsorção de vapor de água, Figura 27).

No estudo realizado por Vargas et al. (2009), onde se prepararam películas de quitosano (1% m/m) compósitas de ácido oleico com uma concentração final de 0%, 1%, 2% e 4% com a adição de *tween 80* a (0,1% v/m), não foi observado qualquer efeito do ácido oleico sobre a permeabilidade dos películas a um a_w nas placas com as amostras de 0,73 e um a_w de 0,59 no exsiccador. Quando se compara este resultado com o gráfico obtido na Figura 29, é interessante observar que a análise estatística

revelou que apenas a partir de uma quantidade de óleo superior a 5% é que se torna possível baixos valores de permeabilidade.

Num estudo mais recente realizado por Vargas *et al.* (2011) onde foram preparadas películas de quitosano (0,5 m/m) compósitas de ácido oleico com uma concentração de 0 e 0,5 m/m, foram observados valores de permeabilidade mais favoráveis com as películas com óleo relativamente às que não continham óleo. Este resultado deveu-se ao fato de as películas de óleo terem sido sujeitas a uma microfluidização com recurso a altas pressões, resultando numa diminuição do tamanho das gotas e um maior número destas dispersas ao longo da matriz, dificultando a entrada de água.

A Figura 30 apresenta a superfície de resposta da permeabilidade à água em função da percentagem de cera de abelha e TPP.

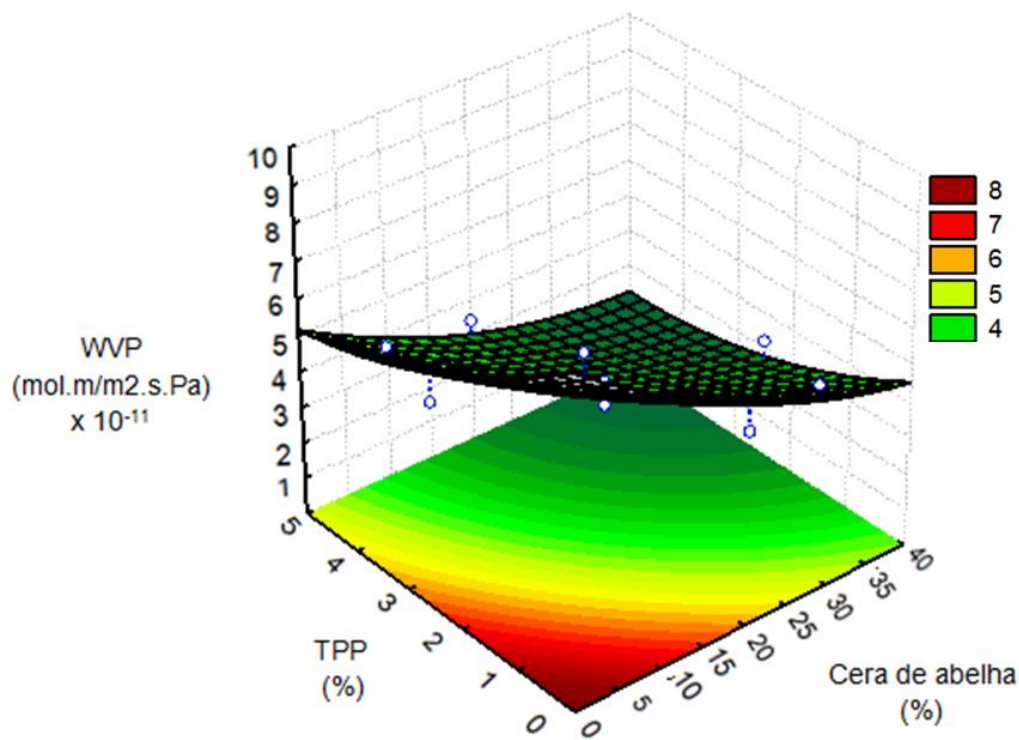


Figura 30: Superfície de resposta obtida para a permeabilidade ao vapor de água das películas de cera.
 $WVP \times 10^{-11} = 8,93 - 0,18 CA^* + 0,0017 CA^2 - 1,23^* TPP + 0,095 TPP^2 + 0,0074 CA TPP$; com um R^2 de 0,89 e um R^2 ajustado de 0,79. * Variáveis que influenciam significativamente a variável dependente ($p < 0,05$)

As variáveis que influenciam significativamente o valor da permeabilidade são os valores lineares da cera de abelha e TPP. Verifica-se que para obter películas com uma baixa permeabilidade ao vapor de água, à medida que a quantidade de TPP vai

diminuindo a quantidade de cera tem de aumentar, sendo que as formulações com menores valores de permeabilidade ($4 \text{ mol.m/m}^2.\text{s.Pa}$) são as que contêm percentagens altas de cera (35% - 40%) e TPP (4% - 5%). De forma inversa, películas com maior permeabilidade correspondem a formulações com uma baixa quantidade de cera (<10%) e TPP (<2%). Este fenómeno explica-se pela ação hidrofóbica da cera que diminui a hidroflicidade da matriz de quitosano e pelo efeito do TPP que torna esta malha muito mais densa, dificultando a difusão do vapor de água na matriz. A menor permeabilidade observada para valores elevados de percentagem de cera vai de encontro aos resultados obtidos nas isotermas de adsorção (> percentagem de cera implica <adsorção de vapor de água, figura 28).

Comparando os resultados obtidos nas formulações de cera com os de óleo, é possível verificar que em ambos foi possível obter valores de permeabilidade idênticos ($4 \text{ mol.m/m}^2.\text{s.Pa}$). Contudo, nas formulações de óleo é possível atingir este valor de permeabilidade usando quantidades de óleo e TPP inferiores aos que são necessários nas formulações de cera. Desta forma, as películas de óleo constituem uma vantagem: para além de se utilizarem quantidades inferiores, formam-se películas mais homogêneas (segundo os resultados observados na microscopia).

Num estudo realizado por Velickova et al. (2013) foram desenvolvidos 4 tipos de películas diferentes: (i) um constituído apenas por quitosano (0,8 % m/m) com 0,2% (m/m) de glicerol e *tween 80*, (ii) um com 3 camadas separadas de cera-quitosano-cera onde o quitosano foi preparado como o filme inicial e a camada de cera era constituída por 0,5% (m/m) de cera e 25% (em relação à quantidade de cera) de *tween 80*, (iii) um com 3 camadas como o anterior mas onde a camada de quitosano foi reticulada recorrendo a uma solução de TPP (0,5 % m/m), (iv) e uma película compósita de quitosano e cera de abelha (10% m/v).

No estudo conduzido em Velickova et al. (2013) foi possível constatar (Tabela 5) que a película compósita de cera diminuiu a permeabilidade do filme de quitosano ($4,15 \times 10^{-11} \text{ mol.m/m}^2.\text{s.Pa}$) em 40%, apresentando um valor de $1,66 \times 10^{-11} \text{ mol.m/m}^2.\text{s.Pa}$. Com as películas em 3 camadas foi igualmente possível obter valores de permeabilidade inferiores aos do filme de quitosano; porém essa diferença observada foi muito menor (na ordem dos $3,00 \times 10^{-11} \text{ mol.m/m}^2.\text{s.Pa}$).

Tabela 5: Resultados verificados para a permeabilidade no estudo de Velickova et al. (2013).

Diferentes tipos de películas	WVP(mol m/m ² s Pa
Película de quitosano	4.15 x 10 ⁻¹¹
Multicamada	2,66 x 10 ⁻¹¹
Multicamada com reticulante	3,26 x 10 ⁻¹¹
Película compósita	1,66 x 10 ⁻¹¹

4.3 Propriedades mecânicas

4.3.1 Testes de extensão

No ensaio da extensão foram determinados os parâmetros da tensão na rutura, deformação na rutura e módulo de *Young* para avaliar a resistência mecânica das películas. Estes testes foram difíceis de executar, uma vez que as amostras utilizadas têm um formato retangular com medidas específicas e o teste consiste em aplicar forças de extensão axial.

Para obter uma boa reprodutibilidade, os retângulos tinham de ter extremidades muito retas e regulares, o que nem sempre era possível no corte devido à natureza rígida e enrugada das películas. Para além desta limitação qualquer fissura ou bolha constitui um ponto de rutura, e quando não detetadas podem dar origem a resultados pouco fiáveis que contribuem para aumentar a sua dispersão.

Existe ainda o fator da heterogeneidade das próprias películas, que por terem origem em emulsões, por vezes a sua microestrutura apresenta partículas de lípidos mal distribuídas, ou no caso da cera, partículas de cera sólidas que não foram bem emulsionadas. Todos estes fenómenos contribuíram para uma grande heterogeneidade nos resultados.

Assim, não foi possível obter uma superfície de resposta para a tensão na rutura e para a deformação na rutura, quer para as películas com ácido oleico quer com cera de abelha. Adicionalmente, o teste estatístico não evidenciou diferenças significativas nos valores de tensão e deformação na rutura entre as várias formulações com cada tipo de lípido.

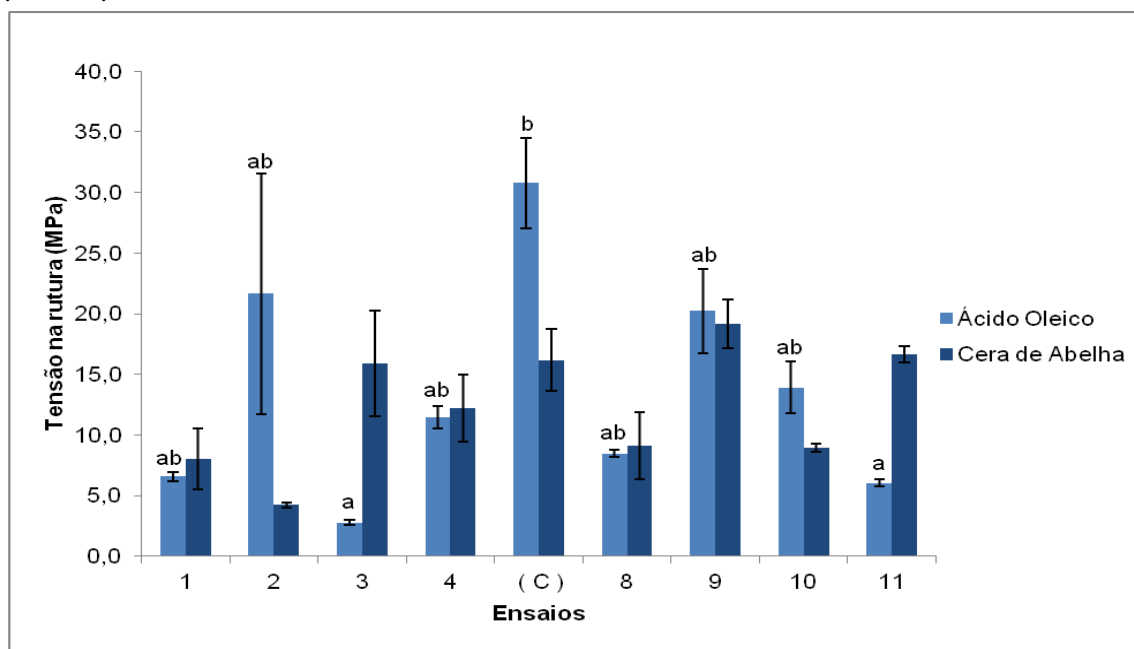


Figura 31: Tensão na rutura, no teste da extensão, para as películas de cera de abelha e ácido oleico, onde C representa a média dos ensaios centrais. As letras a, b, ab são dadas pela análise estatística das médias dos ensaios de óleo, sendo que letras iguais representam médias que não diferem significativamente. As barras pretas representam o desvio padrão.

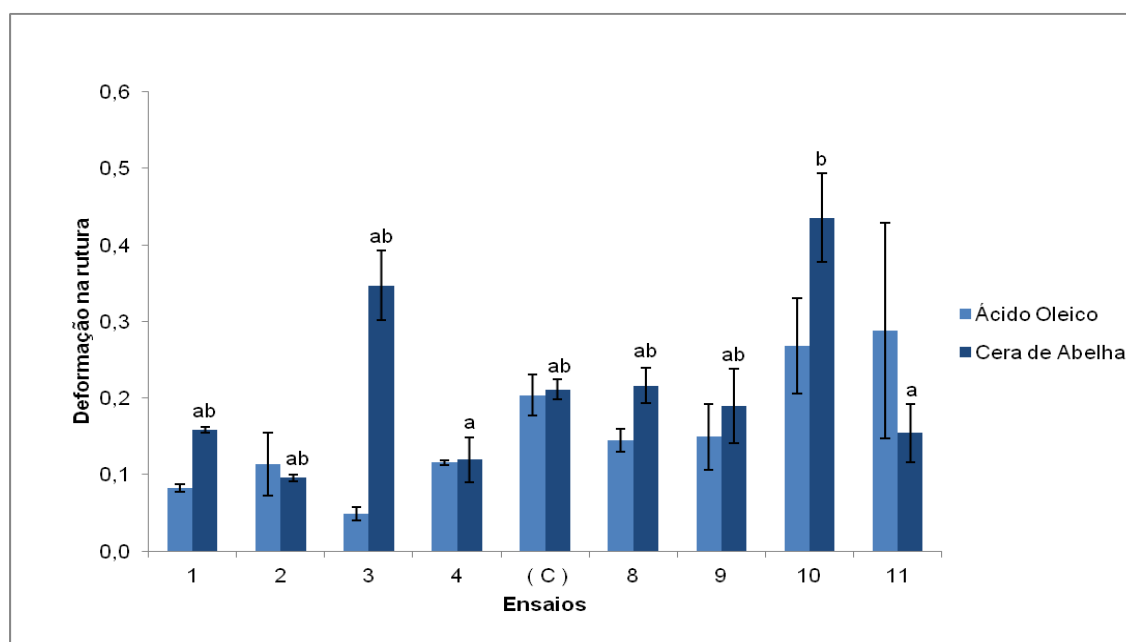


Figura 32: Deformação na rutura, no teste da extensão, para as películas de cera de abelha e ácido oleico, onde C representa a média dos ensaios centrais. As letras a, b, ab são dadas pela análise estatística das médias dos ensaios de cera, sendo que letras iguais representam médias que não diferem significativamente. As barras pretas representam o desvio padrão.

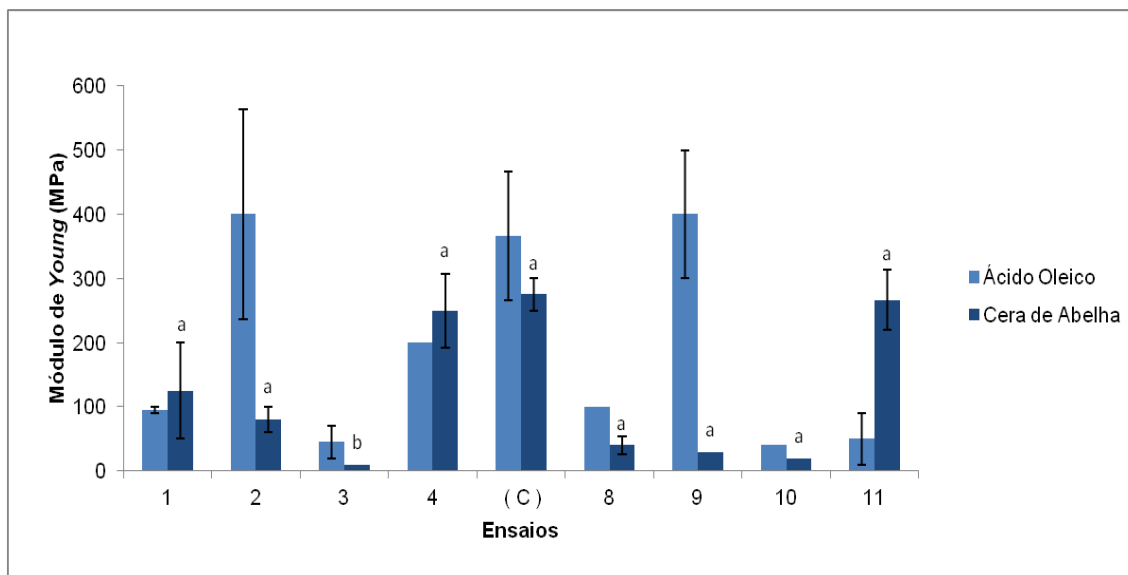


Figura 33: Módulo de *Young* no teste da extensão para as películas de cera de abelha e ácido oleico, onde C representa a média dos ensaios centrais. As letras a e b são dadas pela análise estatística das médias dos ensaios de cera, sendo que letras iguais representam médias que não diferem significativamente. As barras pretas representam o desvio padrão.

Contudo, foi possível ajustar uma superfície de resposta aos valores de módulo de *Young* em função da percentagem de cera de abelha e TPP (Figura 34).

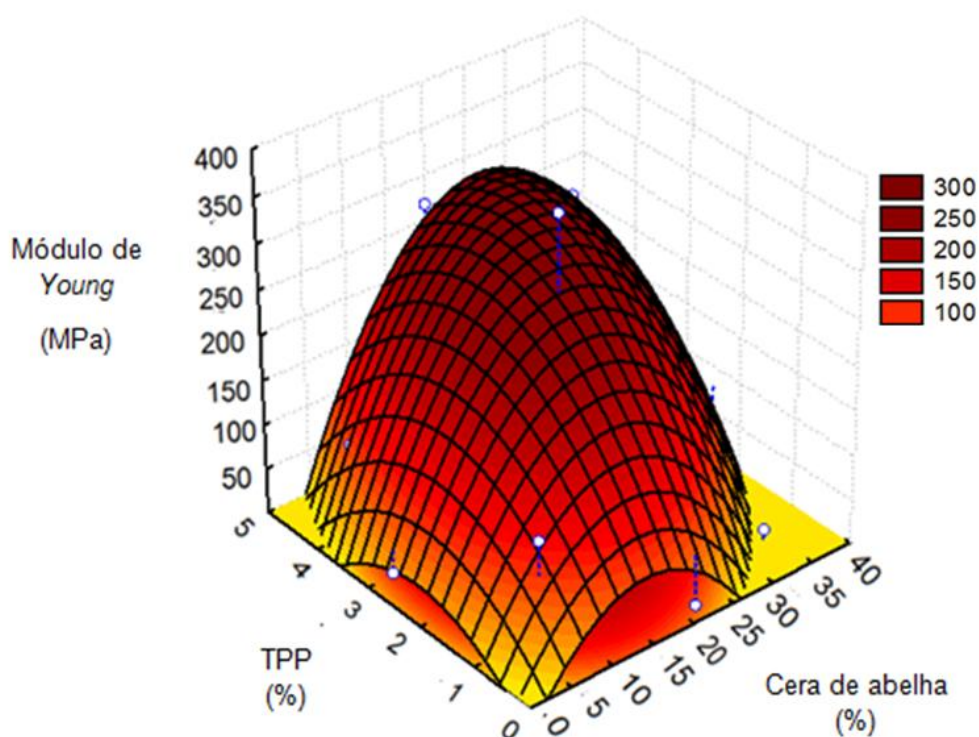


Figura 34: Superfície de resposta obtida para o módulo de *Young* das películas de cera

$$\text{Módulo de Young} = -32,17 + 15,98 \cdot \text{CA} - 0,57 \text{CA}^2 + 76,89 \text{TPP} - 19,09 \cdot \text{TPP}^2 + 2,85 \text{CA TPP};$$

com um R^2 de 0,85 e um R^2 ajustado de 0,70. * Variáveis que influenciam significativamente a variável dependente ($p < 0,05$)

As variáveis que mais influenciam significativamente o valor do módulo de Young são o coeficiente linear da cera de abelha e o quadrático do TPP. Verifica-se que as películas que apresentam um maior valor de módulo de Young (mais rígidas) são as que contêm valores médios de cera de abelha (10% -20%) e TPP (2%-3%). As formulações com menor rigidez são as que contêm um alto teor de cera de abelha com um baixo valor de TPP. O modelo também prevê valores mínimos da rigidez para valores elevados de %TPP (>3%) juntamente com valores elevados de percentagem de cera (>20%). Neste caso, parte do TPP poderá ter ficado por reagir, agindo essa parte como plastificante. Por outro lado, a elevada percentagem de cera produz uma película com um maior número de pontos de descontinuidade na matriz, resultando numa película menos rígida.

No estudo realizado por Velickova et al. (2013) a incorporação de TPP revelou-se favorável ao aumento da rigidez das películas, tendo-se obtido valores elevados de módulo de Young (na ordem dos 425 MPa).

4.3.2 Testes de perfuração

A Figura 35 apresenta a superfície de resposta da tensão de rutura em função da percentagem de cera de abelha e TPP.

As variáveis que mais influenciam significativamente o valor da tensão de rutura são os parâmetros lineares da cera de abelha e TPP. Verifica-se que as películas com maior tensão na rutura são as que resultam de formulações com baixas quantidades de cera (<10%) e elevadas quantidades de TPP (>2%). Por outro lado, o modelo prevê que para elevadas quantidades de cera (>35%) e baixas quantidades de TPP (<2%) resultam películas menos resistentes. Estes resultados podem dever-se ao fato de a presença de cera introduzir pontos de descontinuidade de maior fragilidade resultando numa menor tensão na rutura durante a perfuração. Por outro lado, a presença de TPP reforça a estrutura devido às reações de reticulação.

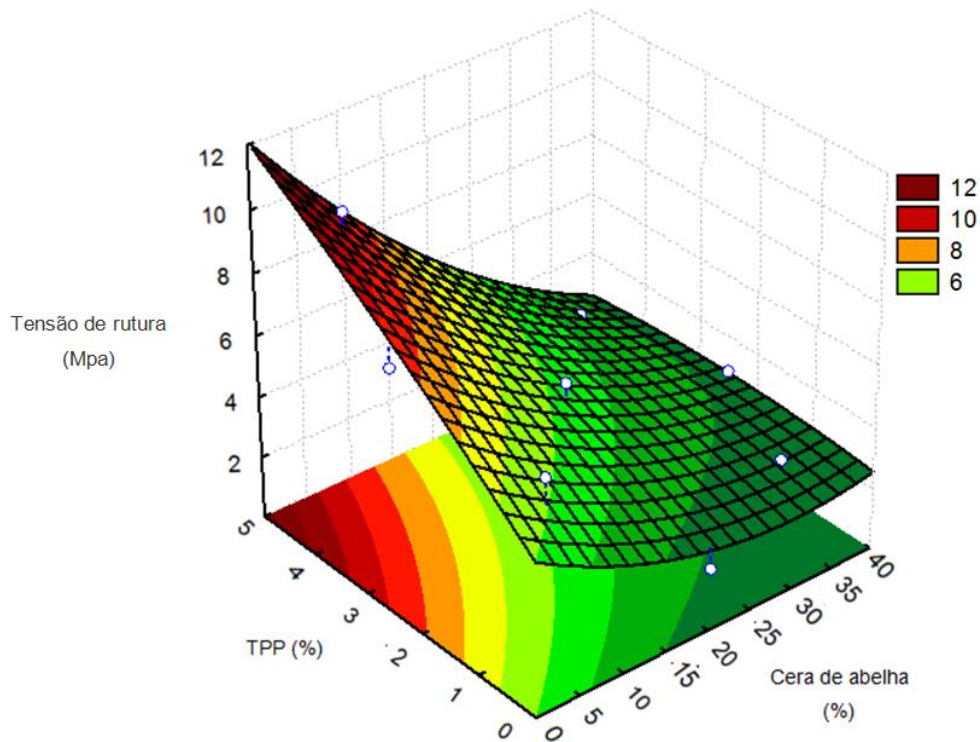


Figura 35: Superfície de resposta obtida para a tensão de rutura das películas de cera
 $Tensão\ de\ rutura = 5,00 - 0,18 \cdot CA + 0,003 \cdot CA^2 + 1,64 \cdot TPP - 0,43 \cdot TPP^2 - 0,04 \cdot CA$; com um R^2 0,96 de e um R^2 ajustado de 0,80. * Variáveis que influenciam significativamente a variável dependente ($p < 0,05$)

Não foi possível obter uma superfície de resposta com um bom ajustamento para os valores de tensão na rutura de ácido oleico. Desta forma procedeu-se a uma comparação estatística das médias das amostras com uma ANOVA a 1 fator para ambos os tipos de películas.

Pela análise estatística (Figura 36) verificamos que, as médias das películas das formulações 3 (34% AO; 0,73% TPP) e 4 (34% AO; 4,3% TPP) não apresentam diferenças significativas entre si, sugerindo que para uma %AO de 34% um aumento da % de TPP de 0,73% para 4,3%, não produz diferenças significativas na tensão na rutura. Da mesma forma, comparando a formulação central (20% AO; 2,5% TPP) e 9 (40% AO; 2,5% TPP), um aumento da %AO de 20% para 40% também não influencia este parâmetro. Na Figura 33 verifica-se ainda que para a mesma quantidade de lípido, não existem diferenças substanciais dos valores de tensão na rutura entre as películas de cera e de ácido oleico.

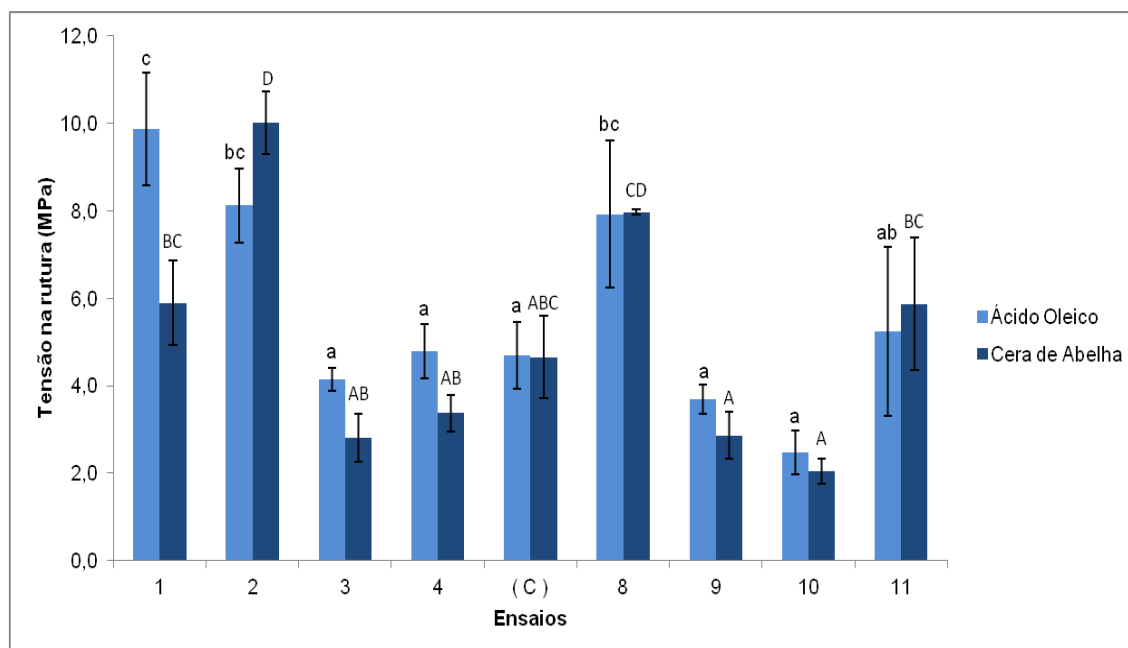


Figura 36: Tensão na rutura, no teste da extensão, para as películas de cera de abelha e ácido oleico, onde C representa a média dos ensaios centrais. As letras a, b, c, ab, bc, A, D, BC, AB, CD e ABC são dadas pela análise estatística das médias dos ensaios de óleo e cera, sendo que letras iguais representam médias que não diferem significativamente. As barras pretas representam o desvio padrão.

Não foi possível determinar uma superfície de resposta com um bom ajustamento para as formulações testadas de ácido oleico e de cera de abelha relativamente à deformação na rutura. A análise estatística das médias da deformação para as películas de ácido oleico (Figura 37) e de cera de abelha (Figura 35) indica que as películas das várias formulações apresentam valores de deformação da rutura não significativamente diferentes entre si. Pode-se salientar que as películas com óleo deformaram entre 3 e 7 vezes o seu comprimento inicial, valores muito próximos aos obtidos para as películas de cera (3 e 8 vezes o seu comprimento inicial).

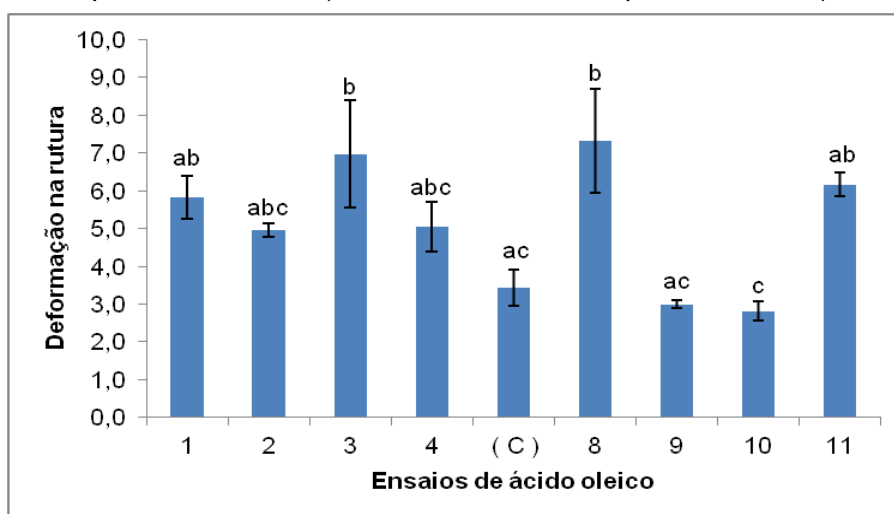


Figura 37: Deformação na rutura para as películas de ácido oleico, onde C representa a média dos ensaios centrais. As letras b, c, ab, ac, e abc são dadas pela análise estatística das médias dos ensaios de óleo, sendo que letras iguais representam médias que não diferem significativamente. As barras pretas representam o desvio padrão.

Estatisticamente, a comparação de médias obtidas para a deformação na rutura (Figura 38), indica que as películas das formulações de cera de abelha que obtiveram uma menor deformação foram os 4 (34% CA; 4,3% TPP) e 9 (40% CA; 2,5% TPP) enquanto que o 10 (20% CA; 0% TPP) foi o que mais deformou, indicando uma grande influência da quantidade de cera e sobretudo do TPP, visto que ao não ter reticulante o ensaio 10 obteve a maior deformação antes da rutura. De acordo com a superfície de resposta obtida para a tensão de rutura da cera (Figura 35), as películas que poderiam ser mais resistentes seriam as das formulações 2 (6% CA; 4,3% TPP) e 8 (0% CA; 2,5% TPP), por conterem uma quantidade de cera inferior a 10% e uma quantidade de TPP a cima dos 2%. Contudo, os valores de deformação parecem apontar para uma resistência média.

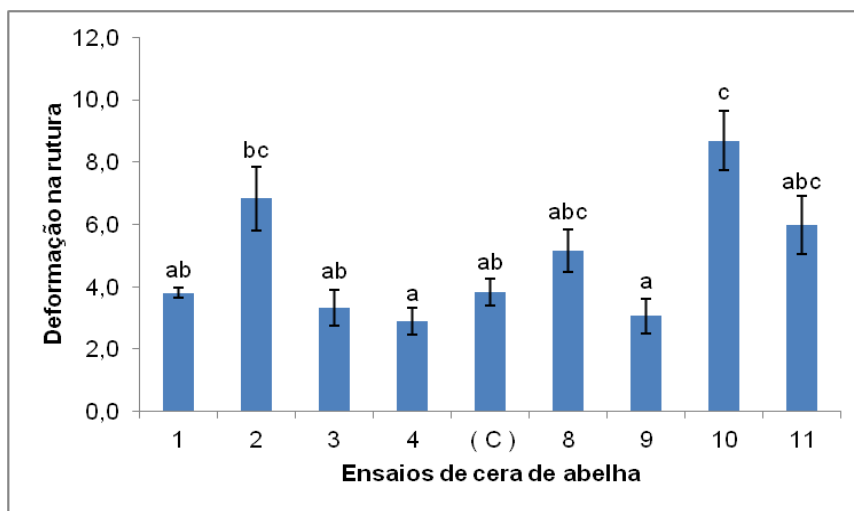


Figura 38: Deformação na rutura para as películas de cera de abelha, onde C representa a média dos ensaios centrais. As letras b, c, ab, ac, e abc são dadas pela análise estatística das médias dos ensaios de óleo, sendo que letras iguais representam médias que não diferem significativamente. As barras pretas representam o desvio padrão.

5. Conclusão

A aparência das películas de ácido oleico revelou-se muito mais homogénea que a aparência das películas com cera de abelha. Após a aplicação do TPP todas as amostras ficaram mais enrugadas e rígidas. Para algumas formulações as películas obtidas eram bastante quebradiças o que dificultava o processo de preparação das amostras, porém uma percentagem de lípido mais elevada ajudava a diminuir esta rigidez e a tornar o material mais maleável.

Foi observada alteração da cor branca para as diferentes películas testadas, dentro da seguinte gama de valores: ΔE entre 10 a 25, para o ácido oleico, e 30 a 20 para a cera de abelha.

A microscopia revelou que introdução de ácido oleico leva à obtenção de películas mais homogéneas e contínuas do que a cera de abelha. A quantidade de TPP tem a capacidade de modificar mais visivelmente as películas de óleo que as de cera, uma vez que as películas de cera apresentam naturalmente uma malha mais heterogénea.

No teste da solubilidade verificou-se que existe uma grande influência da quantidade de TPP na solubilidade das películas de ácido oleico; as formulações menos solúveis são as que contêm valores mínimos ou máximos de TPP, sendo que à medida que se aumenta a quantidade de óleo as películas ficam menos solúveis. Relativamente à cera de abelha verificou-se que independentemente da formulação os resultados obtidos não diferem estatisticamente entre si.

Relativamente à capacidade de absorção de água, verificaram-se resultados bastante elevados para todos os ensaios. Nas películas de ácido oleico pode observar-se alguma influência da quantidade de óleo no comportamento hidrofóbico da matriz polimérica. Para as películas compósitas de cera, existe uma pequena gama de formulações com baixos valores de cera e TPP para as quais a capacidade de absorção de água é baixa.

O estudo das isotermas de adsorção indica que no geral, as películas das formulações com cera de abelha apresentam uma maior adsorção de água que as de ácido oleico, para o mesmo valor de a_w .

Foi possível obter valores de permeabilidade idênticos para ambos os tipos de películas (4 mol.m/m².s.Pa). Contudo, nas formulações de óleo é possível atingir este valor de permeabilidade usando quantidades de óleo e TPP inferiores aos que são necessários nas formulações de cera. Desta forma, as películas com óleo constituem

uma vantagem, para além de utilizar quantidades inferiores, permite a formação de películas mais homogéneas.

No ensaio da extensão o teste estatístico não evidenciou diferenças significativas nos valores de tensão e deformação na rutura entre as várias formulações com cada tipo de lípido. No entanto, verifica-se que as películas de cera, que apresentam um maior valor de módulo de Young (mais rígidas) são as que contêm valores médios de cera de abelha (10% -20%) e TPP (2%-3%).

No teste da perfuração as películas com maior tensão na rutura são as que resultam de formulações com baixas quantidades de cera (<10%) e elevadas quantidades de TPP (>2%), sendo que para a mesma quantidade lípido, não existem diferenças substanciais dos valores de tensão na rutura entre as películas de cera e de ácido oleico. Foi ainda observado que as películas com óleo deformaram entre 3 e 7 vezes o seu comprimento inicial, valores muito próximos aos obtidos para as películas de cera (3 e 8 vezes o seu comprimento inicial).

6. Trabalho Futuro

Antes de ser possível desenvolver qualquer trabalho futuro com as películas compósitas de abelha, é necessário otimizar o seu modo de fabrico. É essencial encontrar técnicas que permitam uma boa fusão da cera de forma a formar uma boa emulsão e encontrar um processo de remoção de bolhas de ar que não comprometa a temperatura a que se encontra a solução filmogénica, nem obrigue a solução a ficar sujeita a longos períodos em repouso. Talvez a solução passa por encontrar placas de aquecimento com uma maior capacidade de forma a ser possível fazer mais quantidade de solução filmogénica de cada vez e uma estufa de vácuo com capacidade de manter a temperatura da solução filmogénica enquanto faz a remoção das bolhas de ar.

Para ambos os tipos de películas é necessário encontrar formas de secagem mais rápidas e suportes de secagem que permitam uma espessura constante ao longo das diferentes amostras de película. Seria conveniente utilizar caixas de acrílico cujas divisórias fossem mais regulares e estanques.

Numa próxima abordagem do trabalho é conveniente fazer uma centrifugação da solução-mãe de quitosano para remover as partículas indesejáveis que se incorporam na preparação desta solução.

Uma vez que o estudo das isotermas de adsorção de água mostra que para as películas de óleo apenas se conseguem distinguir diferenças significativas no comportamento das mesmas em valores de a_w a cima dos 0,75, seria interessante utilizar nos ensaios de permeabilidade uma solução (nas caixas de vidro) com um a_w um pouco mais elevado (aproximadamente de 0,85).

Seria pertinente uma futura medição às propriedades de barreira aos gases, nomeadamente ao oxigénio e dióxido de carbono de forma a aferir o possível efeito na diminuição da taxa respiratória dos produtos hortofrutícolas.

Ultrapassadas as questões anteriores é importante estudar o efeito de cada formulação na atividade microbiana, assim como a aplicação em diferentes tipos de produtos hortofrutícolas de modo a estudar a sua eficiência no controlo de todos os processos fisiológicos e microbiológicos, demonstrando um aumento médio de vida, sem que a qualidade organolética seja comprometida. Para tal devem ser escolhidos tecidos vegetais mais sensíveis como peras, maçãs, morangos ou cenouras.

7. Referências bibliográficas

Abreu, M. (2009) *Tratamentos integrados para a qualidade de pêra rocha minimamente processada*. Tese de Doutoramento em Engenharia Agro-Industrial. Instituto Superior de Agronomia .Universidade de Lisboa;

Aider, M. (2010) Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. LWT- Food Science and Technology. Volume 43, pp 837- 842;

Agudo, A. (2005) Measuring intake of fruit and vegetables . WHO library Cataloguing-in-Publication. Instituto Catalão de Oncologia. Espanha. Disponível em: http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/f&v_intake_measurement.pdf?ua=1; Consultado dia 16 de Fevereiro de 2015;

Almeida, D (2005) Manuseamento de produtos hortofrutícolas. 1ª edição. Sociedade Portuguesa de Inovação Consultadoria Empresarial e Fomento de Inovação, S.A., Porto;

Alves, V. D., Costa, M., Coelho, I. M. (2010) Barrier properties of biodegradable composite films based on Kappa-carrageenan/pectin blends and mica flakes. Carbohydrate Polymers. Volume 69, pp. 269-276;

Azevedo, V. V. C., Chaves, S. A., Bezerra, D. C., Fook, M. V.L., Costa, A. C. F. M. (2007) Quitina e Quitosana: Aplicação como biomateriais. Revista Eletrônica de Materiais e Processos. Volume 23, pp 27-34;

Baldwin, E. (2007) Handbook of Food Preservation. 2ª edição. Editora CRC Press. 21 capítulo, pp 481- 488;

Barros, M. (2008) Revestimentos Funcionais de Base Quitosano Desenvolvimentos de Aplicações para a Indústria do Calçado. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química. Escola Superior de Tecnologia e de Gestão. Instituto Politécnico de Bragança;

Beirão-da-Costa, S. (2007) *Metodologias integradas para a conservação de kiwi minimamente processado*. Tese de Doutoramento em Engenharia Agro-Industrial. Instituto Superior de Agronomia. Universidade de Lisboa;

Benevides, C. M. J., Souza, M. V., Souza, R.D.B., Lopes, M. V. (2011) Fatores Antinutricionais em Alimentos: Revisão. Segurança Alimentar e Nutricional, Campinas. Volume 18, pp 67-79;

Bonilla, J., Vargas, M., Atarés, L., Chiralt, A. (2011) Physical properties of chitosan-basil essential oil edible films as affected by oil content and homogenization conditions. *Procedia Food Science*. Volume 1, pp 50-56;

Borgognoni F., Polakiewicz B., Pitombo R., (2006) Estabilidade de emulsões de limoneno em quitosana modificada, *Ciência e Tecnologia Alimentar*. Volume 26, pp 502–508;

Callegarin, F. Gallo, J. A. Q., Debeaufort, F., Voilley, A. (1997). Lipids and Biopackaging: Review. *Journal of the American Oil Chemists Society*. Volume 74, pp 1183-1192;

Castro, A., Pouzada, A. (2003) Embalagens para a indústria alimentar. Instituto Piaget. Impressão Tipografia Tadinense. 2ª edição;

Cerqueira, M.(2010) Development and characterization of edible coatings to the preservation of cheese quality. Tese de Doutoramento em Engenharia Química e Biológica. Universidade do Minho. Escola de Engenharia;

Cordeiro, C. (2010) Desenvolvimento de filmes bioactivos a partir do quitosano. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Agronomia. Universidade de Lisboa;

Damian, C., Beirão, L. H., Francisco, A., Espírito Santo, M. L. P., Teixeira, E. (2005) Quitosana: Um amino polissacarídeo com características funcionais. *Alimentação e Nutrição*. Volume 16, pp 195-205;

De Sá, C.P.M. (1994) Digital Analysis of SEM Images for Materials Characterization and Interface/Surface Studies of Biological Materials. Elsevier;

De Sá, C.P.M. (1994) Caracterização morfológica, microestrutural e microanalítica de materiais por microscopia electrónica de varrimento e a micro-análise por raiosx, CEMUP, Porto;

Dutta, P. K., Tripathi, S., Mehrotra, G. K., Dutta, J. (2009) Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food application. Food Chemistry. Volume 114, pp 1173-1182;

Devlieghere, F., Vermeulen, A., Debevere, J. (2004) Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. Food Microbiology. Volume 21, pp 703 – 714;

Duarte, T. (2010) Técnicas de Microscopia aplicadas a Materiais de Base Cimentícia. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Civil-Especialização em Materiais e Processos de Construção. Faculdade de Engenharia. Universidade do Porto;

Early, R. (2002) Fruit and vegetables processing- Improve quality. England: Woodhead Publishing Limited;

Elsabee, M.; Abdou, E. (2013) Chitosan based edible films and coatings: A review. Elsevier – Materials Science and Engineering C. Volume 33, pp 1819 – 1841;

EUFIC (2012). O consumo de fruta e legumes na Europa- os europeus consomem o suficiente?. Disponível em:<http://www.eufic.org/article/pt/expid/Fruit-vegetable-consumption-Europe>, consultado dia 16 de Fevereiro de 2015;

Fonseca, J. (2012) Revestimentos comestíveis à base de quitosano e cera de abelha: aplicação na conservação da uva de mesa. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Agronomia. Universidade de Lisboa;

Gavhane Y. N., Gurav A. S., Yadav, A. V. (2013) Chitosan and it's applications: A review of Literature. International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences. Volume 4, pp 312 – 328;

Guilbert, S., Gontard, N., Gor, L. G.M. (1996) Prolongation of the Shelf-life of Perishable Food Products using Biodegradable Films and Coatings. Food Science and Technology. Volume 29, pp 10-17;

Gonçalves, A. (2007) Efeito da Aplicação de Revestimentos Comestíveis Enriquecidos em Antioxidantes na Conservação de Frutos Minimamente Processados. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Controlo de Qualidade e Toxicologia dos Alimentos. Faculdade de Farmácia. Universidade de Lisboa;

Marques, S. (2012) Edible coatings based on chitosan-beeswax emulsions. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química e Bioquímica. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa;

Moldão-Martins, M. (2012) *Aulas de Tecnologia de Produtos Hortofrutícolas*. Universidade Técnica de Lisboa. Instituto Superior de Agronomia;

Moldão-Martins, M., Empis, J. (2000) Produtos hortofrutícolas frescos ou minimamente processados – Processamentos mínimos. Sociedade Portuguesa de Inovação. 1ª edição. Porto. 4, pp 99;

Kader, A. A. (2007) *Tecnologia Postsecha de Cultivos Hortofrutícolas*. 3º edição. Univesidade da California, Divisão de Agricultura e Recursos Naturais ;

Kamper, S. L., Fennema, O. (1984) Water Vapor Permeability of Edible Bilayer Films. *Journal of Food Science*. Volume 49, pp 1478-1481;

Kester, J. J., Fennema, O. R. (1986) Edible Films and Coatings. A review. *Food Technology*. Volume 12, pp 47-59;

Krochta, J. M., Mulder-Johnston, C. (1997) Edible and Biodegradable Polymer films: Challenges and Opportunities. *Food Technology*. Volume 5, pp 64-74;

Krochta, J. M. (2002). *Proteins as Raw Materials for Films and Coatings: Definitions, Current Status, and Opportunities*. Editora CRC Press. Florida;

Lang, K., Steinberg, M: P. (1981). Linearization of the Water Sorption Isotherm for Homogeneous Ingredients over a 0.30 – 0.95. *Journal of food science*. Volume 46, pp 1450-1452;

Lin, D., Zhao, Y. (2007). Innovations in the Development and Application of Edible Coatings for Fresh and Minimally Processed Fruits and Vegetables. *Food Science and Food Safety*. Volume 6, pp 60-75;

Oetterer, M., Regitano-d'Arce, M., Spoto, M. (2006) *Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Manole. Tamboré, Brasil. pp 403-564;

Silva, F., Morais, A. (2000) Boas Práticas pós-Colheita para Frutos Frescos. 1ª Edição, Serviços de Edição da ESB/UCP. Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica;

Singla, A. K., Chawla, M. (2001) Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects- an update. Journal of pharmacy and pharmacology. Volume 53, pp 1047 – 1067;

Sinha, V.R., Singla, A.K., Wadhawan, S., Kaushik, R.; Kumria, R., Bansal, K., Dhawan, S. (2004). Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. International Journal of Pharmaceutics. Volume 274, pp 1–33;

Sonti, S. (2003) Consumer Perception and Application of Edible Coatings on Fresh-Cut Fruits and Vegetables. Thesis for the degree of Master of Science in the Department of Food Science. Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College;

Tanada-Palmu, P.S., Grosso, C. R.F. (2005) Effect of edible wheat gluten-based films and coatings on refrigerated strawberry (*Fragaria ananassa*) quality. Postharvest Biology and Technology. Volume 36, pp 199-208;

Vargas, M., Albors, A., Amparo, C., González-Martínez, C. (2009) Characterization of chitosan-oleic acid composite films. Food Hydrocolloids. Volume 23, pp 536-547;

Vargas, M., Perdoner, A., Chiralt, A., Cháfer, M., González-Martínez, C. (2011) Effect of the homogenization conditions on physicochemical properties of chitosan-based film-forming dispersions and films. Food Hydrocolloids. Volume 25, pp 1158-1164;

Veiga, A., Lopes, A., Carrilho, E., Silva, L., Dias, M.B., Seabra, M.J., Borges, M., Fernandes, P., Nunes, S., Ferreira, S. (2012) Perfil de risco dos principais alimentos consumidos em Portugal. Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. Direcção de Avaliação e Comunicação dos Riscos. Lisboa;

Velickova, E., Winkelhausen, E., Slobodanka, K., Alves, V., Moldão-Martins, M. (2013) Impact of chitosan-beeswax edible coatings on the quality of fresh strawberries (*Fragaria ananassa* cv Camarosa) under commercial storage conditions. LWT – Food Science and Technology. Volume 52, pp 80-92;

World Health Organization (2003) Fruit and Vegetables Promotion Initiative/ A meeting report. Suíça. Disponível em: http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/f&v_promotion_initiative_report.pdf?ua=1, Consultado dia 16 de Fevereiro de 2015;

Wu, Y., Weller, C. L., Hamouz, F., Cuppett, S. L., Schnept, M. (2002) Development and application of multicomponent edible coatings and films: A review. Academic Press. *Advances in Food and Nutrition Research*. Volume 44, pp 347-39.